



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel

DNA-Methylierung als epigenetischer Regulator von fünf
Genen im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC)

durchgeführt an der Medizinischen Universität Wien,
Universitätsklinik für Innere Medizin I, Klinische Abteilung für Onkologie

Verfasserin

Marlene Maria Gertraud Weinzierl

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A442

Studienrichtung laut Studienblatt: Diplomstudium Anthropologie

Betreuerin: Ao. Univ.Prof. Dr. Sabine Zöchbauer-Müller

Teile dieser Diplomarbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Heller G, Babinsky V, Ziegler B, Weinzierl M, Noll C, Altenberger C, Müllauer L, Dekan G, Grin Y, Lang G, End-Pfützenreuter A, Womastek I, Zehetmayer S, Döme B, Arns B-M, Fong K, Wright C, Yang I, Bowman R, Klepetko W, Posch M, Zielinski C, Zöchbauer-Müller S: **Genome-wide CpG-island methylation analyses in non-small cell lung cancer patients**. Eingereicht.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig und mit äußerster wissenschaftlicher Sorgfalt verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Sämtliche Inhalte wie Texte und Bilder von fremden Quellen sind durch einen Verweis auf die jeweilige Quelle gekennzeichnet. Sollte dennoch der unwahrscheinliche Fall von Hinweisen auf die Verletzung von Urheberrechten eintreten, so ersuche ich zwecks Klärung möglicher Zusammenhänge um Kontaktaufnahme.

Danksagung

Diese Diplomarbeit steht am Ende eines arbeitsintensiven Studiums und präsentiert die Ergebnisse meiner Forschungsarbeit, die ich auf dem spannenden Gebiet der Epigenetik durchführen durfte. An dieser Stelle nutze ich die Gelegenheit, jenen Personen, die maßgeblich an der Verwirklichung meiner Ziele beteiligt waren oder mich auf diesem Weg begleitet haben, meine tiefe Verbundenheit auszudrücken.

Mein spezieller Dank geht an Frau Univ.-Prof. Dr. Zöchbauer-Müller und Dr. Gerwin Heller, die mir ihr Vertrauen geschenkt und die Möglichkeit geboten haben, an ihren hochrangigen Forschungen mitzuarbeiten und in ihren Laborräumlichkeiten meine Diplomarbeit durchzuführen. Ich bedanke mich bei ihnen ganz herzlich für die hervorragende Ausstattung, die mir zur Verfügung gestellt wurde, für die kompetente und persönliche Betreuung sowie die Durchsicht und Evaluierung der Diplomarbeit. Ein großes Dankeschön gebührt auch meinen anderen KollegInnen innerhalb wie außerhalb der Arbeitsgruppe im Anna Spiegel Forschungsgebäude sowie den WissenschaftlerInnen und MitarbeiterInnen der Klinischen Abteilung für Onkologie im Gebäude des AKH Wien. Vor allem bedanke ich mich bei Barbara Ziegler, die es in besonderer Weise schafft, Herzlichkeit, Humor und Professionalität zu verbinden und wesentlich dazu beigetragen hat, dass ich mich von Beginn an als Teil des Teams gefühlt habe. Der produktive Arbeitsalltag, aber auch die persönlichen Kontakte in diesem Umfeld haben mein Leben sowohl auf beruflicher als auch auf privater Ebene sehr bereichert.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Freund Stefan, der mich immer schon mit vielen Büchern und Projekten teilen musste und trotzdem dafür gesorgt hat, dass ich und meine Diplomarbeit den Krieg gegen den Computer stets gewinnen. Auch das Verständnis meines geduldigen Freundeskreises, Treffen langfristig auszumachen und dafür kurzfristig abzusagen, hat ebenso wie deren emotionale Unterstützung meinen Alltag erleichtert und verschönert. Von Herzen danken möchte ich meinem Bruder Marco und allen meinen Verwandten, die die Stationen meines Lebens mitverfolgt, mich gefördert und mit positiven Gedanken bedacht haben.

Ganz besonders aber danke ich meinen Eltern Maria und Josef. Sie haben mir immer vermittelt, dass mein Weg auch für sie der richtige ist. Danke, dass ihr immer für mich da wart und an mich geglaubt habt. Diese Diplomarbeit widme ich euch.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	Seite	9
Summary	Seite	11
1 EINFÜHRUNG	Seite	13
1.1 Lungenkrebs – Zahlen und Fakten	Seite	13
1.2 Histologische Klassifikation von Lungenkarzinomen	Seite	14
1.3 Stadien beim Lungenkarzinom	Seite	15
1.4 Ätiologie des Lungenkarzinoms	Seite	16
1.4.1 Tabakrauch	Seite	17
1.4.2 Weitere Risikofaktoren für Lungenkrebsentstehung	Seite	22
1.5 Molekulare Mechanismen der Krebsentstehung	Seite	22
1.5.1 Schlüsselereignisse der Tumorigenese	Seite	24
1.5.1.1 Aufrechterhaltung der Proliferation	Seite	25
1.5.1.2 Evasion von Wachstumssuppressoren	Seite	26
1.5.1.3 Verhinderung des Zelltods	Seite	27
1.5.1.4 Replikative Immortalität	Seite	27
1.5.1.5 Angiogenese	Seite	28
1.5.1.6 Aktivierung von Invasionen und metastatischer Dissemination	Seite	29
1.5.2 MicroRNAs	Seite	30
1.5.3 DNA-Reparatur	Seite	30
2 HINTERGRUND	Seite	32
2.1 DNA-Methylierung	Seite	32
2.1.1 DNA-Methyltransferasen	Seite	32
2.1.2 CpG-Inseln	Seite	34
2.2 Mechanismen der Gen-Inaktivierung durch DNA-Methylierung	Seite	35
2.2.1 Methyl-CpG-bindende Proteine.....	Seite	35
2.2.2 Histonmodifikationen.....	Seite	36
2.2.3 Nukleosomenpositionierung.....	Seite	37
2.3 DNA-Methylierung beim NSCLC	Seite	38
2.4 Potentielle Bedeutung der DNA-Methylierung als Biomarker	Seite	42

2.5	Reaktivierung von durch DNA-Methylierung inaktivierten Genen	Seite 42
3	PRÄLIMINÄRE DATEN UND ZIELE	Seite 45
3.1	Präliminäre Daten	Seite 45
3.2	Ziele dieser Diplomarbeit	Seite 46
3.2.1	Entwicklung genspezifischer Methylierungsanalysen	Seite 46
3.2.2	Vergleich der Methylierungsdaten von NSCLC-PatientInnen mit deren klinisch-pathologischen Charakteristika	Seite 47
4	MATERIAL UND METHODEN	Seite 48
4.1	NSCLC-PatientInnen und NSCLC-Zelllinien.....	Seite 48
4.1.1	Zellkultur	Seite 49
4.1.2	Behandlung von Zelllinien mit Aza-dC und TSA	Seite 49
4.1.3	Isolierung genomischer DNA	Seite 50
4.2	Etablierung der MS-HRM zur quantitativen Analyse von Methylierungen ...	Seite 50
4.2.1	Natrium-Bisulfit-Behandlung der genomischen DNA	Seite 50
4.2.2	Primerdesign für MS-HRM-Analysen	Seite 53
4.2.3	Methylierungssensitive, hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM)	Seite 54
4.3	Genomische Bisulfitsequenzierung (BGS)	Seite 57
4.3.1	Primerdesign für die Bisulfitsequenzierung	Seite 58
4.3.2	Amplifizierung und Purifikation der DNA	Seite 58
4.3.3	Klonierung und Sequenzierung	Seite 60
4.4	Western Blot zur Überprüfung der Proteinexpression	Seite 63
4.4.1	Proteinisolierung aus gefrorenem nicht-malignen Lungengewebe	Seite 63
4.4.2	Proteinisolierung aus Zellpellets	Seite 64
4.4.3	Messung der Proteinkonzentration nach Bradford	Seite 64
4.4.4	Western Blot	Seite 66
4.5	Verwendete Materialien und Geräte allgemein	Seite 70
5	RESULTATE	Seite 71
5.1	Ergebnisse der MS-HRM-Analysen	Seite 71
5.1.1	Test der entwickelten BSP-Primerpaare	Seite 71
5.1.2	Ergebnis der MS-HRM-Analyse von NSCLC-Zelllinien	Seite 72

5.1.3	Ergebnis der MS-HRM-Analyse von DNA-Proben aus Tumor- und korrespondierendem nicht-malignen Lungengewebe von NSCLC-PatientInnen	Seite 78
5.2	Ergebnis der genomischen Bisulfitsequenzierung (BGS)	Seite 84
5.3	Vergleich der Methylierungsdaten von NSCLC-PatientInnen mit deren klinisch-pathologischen Charakteristika	Seite 86
5.4	Ergebnisse der Western Blots	Seite 87
6	DISKUSSION	Seite 90
	Abkürzungen	Seite 97
	Abbildungsverzeichnis	Seite 100
	Quellenangaben	Seite 102
	Curriculum vitae	Seite 142

ZUSAMMENFASSUNG

Das Lungenkarzinom ist eine der häufigsten Krebsarten mit jährlich über einer Million Todesopfer weltweit. Es handelt sich dabei um eine heterogene Erkrankung, die in den meisten Fällen erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Der Großteil aller Lungenkrebserkrankungen betrifft das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC, ca. 80 %), dem sich diese Forschungsarbeit widmet.

Molekulare Abnormalitäten bei einer Lungenkrebserkrankung sind mannigfaltig. Genetische Veränderungen wie Mutationen sind ebenso Grund für maligne Entartungen der Zelle wie epigenetische Mechanismen. Zu letzteren zählt die DNA-Methylierung, die im Zusammenspiel mit Histonmodifikationen und Nukleosomen(re)positionierungen die Chromatinstruktur von Genen verändern und so die Genexpression beeinflussen kann. Aberrante Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promoterbereich kann eine Inaktivierung der betreffenden Gene bewirken und führt in vielen Fällen zu deren Funktionsverlust.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der DNA-Methylierung bei der Pathogenese von NSCLC untersucht. Hierfür haben wir das Methylierungsmuster der Gene *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* in fünf NSCLC-Zelllinien sowie in Primärtumor- und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von 97 NSCLC-PatientInnen mittels methylierungssensitiver, hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) analysiert. Wir konnten eine statistisch signifikante tumorspezifische Methylierung der Gene (*EVX1*: 68%, *HOXA9*: 40%, *IRX2*: 56%, *PCDHA12*: 62%, *SFMBT2*: 45%) feststellen. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch Sequenzierungsanalysen, die zeigten, dass 73 – 100 % der untersuchten CpGs im Tumorgewebe methyliert sind, während im assoziierten nicht-malignen Lungengewebe nur 0-1 % der untersuchten CpGs eine Methylierung aufwiesen. Zur Ermittlung einer potentiellen klinischen Relevanz dieser Ergebnisse wurde ein Vergleich der Methylierungsdaten mit den klinisch-pathologischen Charakteristika der PatientInnen angestellt. Dieser ergab, dass die Methylierung von *EVX1* und *SFMBT2* mit einem höheren Lebensalter der PatientInnen zum Zeitpunkt der Erkrankung in Zusammenhang steht, dass PatientInnen mit *SFMBT2*-Methylierung häufiger an einem Plattenepithelkarzinom erkrankt waren als an einem Adenokarzinom und dass eine Methylierung von *HOXA9* bei Plattenepithelkarzinom-PatientInnen mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben im Vergleich zu PatientInnen ohne *HOXA9*-Methylierung korreliert. Um zu überprüfen, ob die Methylierung die Genexpression beeinflusst, wurden Western Blots zur Detektion der Proteinexpression von *SFMBT2* in nicht-malignem Lungengewebe sowie in Lungenkrebs-Zelllinien durchgeführt. Es zeigte sich, dass *SFMBT2* im normalen, unmethylierten Lungengewebe exprimiert wird, während in methylierten Zelllinien keine Expression des Proteins stattfindet. Nach Behandlung der Lungenkrebs-Zelllinie A549 mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-Deoxycytidin und/oder dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A hingegen konnte eine Hochregulierung der Genexpression von *SFMBT2* beobachtet werden.

Diese Resultate stützen unsere Vermutung, dass die tumorspezifische Methylierung bestimmter Gene als epigenetischer Regulator der Genexpression in NSCLC-Gewebe wirkt. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen weisen auf die DNA-Methylierung als wesentlichen Faktor in der Pathogenese des NSCLC und deren potentielle klinische Relevanz hin.

SUMMARY

Lung cancer is one of the most frequently occurring cancer types with over a million deaths worldwide each year. It is a heterogeneous disease which is usually diagnosed in advanced stages. This master thesis is concerning non-small cell lung cancer (NSCLC) which accounts for the majority of all lung cancer diseases (~ 80 %).

Certain molecular abnormalities have been identified in lung cancer. Genetic modifications such as mutations lead to malignant degeneration of cells as well as epigenetic mechanisms. The latter includes DNA methylation which alters chromatin structure together with histone modifications and chromatin remodeling complexes to control gene expression. Aberrant hypermethylation of CpG islands within a promoter region may inactivate the gene concerned and leads to loss of their function in many cases.

In our studies we investigated the role of DNA methylation in the pathogenesis of NSCLC. Therefore we analysed patterns of methylation of the genes *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* in five NSCLC cell lines as well as in primary tumor and corresponding non-malignant lung tissues of 97 NSCLC patients with methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM). We observed statistically significant tumorspecific methylation of the genes (*EVX1*: 68%, *HOXA9*: 40%, *IRX2*: 56%, *PCDHA12*: 62%, *SFMBT2*: 45%). Our results have been approved by genomic bisulfite sequencing. While only 0-1 % of the analysed CpGs in non-malignant lung tissues were methylated, 73-100 % of the analysed CpGs in associated tumor tissues were methylated.

To investigate if these results may be of potential clinical relevance, we compared methylation data with clinico-pathological characteristics of the patients. We found that methylation of *EVX1* and *SFMBT2* is associated with a higher age of patients at diagnosis of NSCLC. Furthermore, methylation of *SFMBT2* was found more frequently in patients with squamous cell carcinoma than in adenocarcinomas. Methylation of *HOXA9* in patients with squamous cell carcinoma correlates with a shorter disease-free survival as compared to patients without *HOXA9* methylation.

Moreover, to verify our hypothesis that methylation influences gene expression, we performed immunoblotting to detect protein expression of *SFMBT2* in non-malignant lung tissue as well as in lung cancer cell lines. We observed expression of *SFMBT2* in unmethylated normal lung tissue but no expression of this protein in methylated cell lines.

After treatment of lung cancer cell line A549 with the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine and/or the histone deacetylase inhibitor trichostatin A upregulation of *SFMBT2* expression was observed. These results support our suggestion that tumorspecific methylation of certain genes acts as an epigenetic regulator of gene expression in NSCLC.

Our findings indicate that DNA methylation is an important factor in the pathogenesis of NSCLC and suggest that DNA methylation of certain genes might be of potential clinical relevance.

1. Einführung

1.1 Lungenkrebs – Zahlen und Fakten

Vor 150 Jahren wurde das Lungenkarzinom zweifellos noch als medizinische Rarität betrachtet. Im Wandel der Zeit hat sich dieses Bild drastisch verändert. Während im Jahr 1878 nur 1 % aller Krebserkrankungen auf maligne Lungentumore zurückzuführen war, stieg dieser Wert bis zum Jahr 1927 auf über 14 % [1]. Heute ist Lungenkrebs eine der am häufigsten diagnostierten Krebsarten weltweit und begründet die Haupttodesursache unter männlichen sowie die zweithäufigste Todesursache der weiblichen KrebspatientInnen. Weltweit sterben derzeit jährlich über eine Million Menschen an dieser Krankheit [1, 2].

Global betrachtet leben die meisten an Lungenkrebs erkrankten Personen in den Industrienationen, d.h., den technisch hoch entwickelten Staaten der sogenannten Ersten Welt, während die niedrigsten Lungenkrebsraten in weniger entwickelten Ländern zu finden sind (siehe Abb. 1). [2, 3]. In Österreich wurden laut Statistik Austria im Jahr 2008 4.141 Lungenkrebs-Neuerkrankungen verzeichnet, das entspricht 12 % aller malignen Neubildungen der österreichischen Bevölkerung. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung liegt in Österreich zwischen dem 58. und 65. Lebensjahr, wobei das Risiko einer Erkrankung ab dem 50. Lebensjahr stark im Steigen begriffen ist. Beim Lungenkrebs handelt es sich wie in anderen Industriestaaten auch in Österreich – nach dem Prostatakrebs – um die zweithäufigste Krebslokalisation bei Männern (2008: 14,7 % der Krebsneuerkrankungen) und um die nach Brust- und Darmkrebs dritthäufigste Krebserkrankung bei Frauen (2008: 8,8 %). Derzeit ist die (altersberichtigte) Lungenkrebsinzidenz bei Österreichs Männern um das 2,2-fache höher als bei den Frauen, nachdem von 1998 bis 2008 bei den männlichen Patienten ein Rückgang der Neuerkrankungen um 15,7 % zu vermerken war, während bei den weiblichen Patientinnen im selben Zeitraum ein Anstieg um 25,8 % verzeichnet wurde. Das Risiko, bis zum 75. Lebensjahr an einem Lungenkarzinom zu erkranken, betrug im Jahr 2008 für die männlichen Österreicher 4,7 % und für die österreichischen Frauen 2,1 %. 2008 endete die Erkrankung für 1.241 von Österreichs Frauen (13,5 % aller Krebstodesfälle) und für 2.500 von Österreichs Männern (23,7 %) letal [4-6].

ASR pro 100.000, weltweit, alle Altersstufen

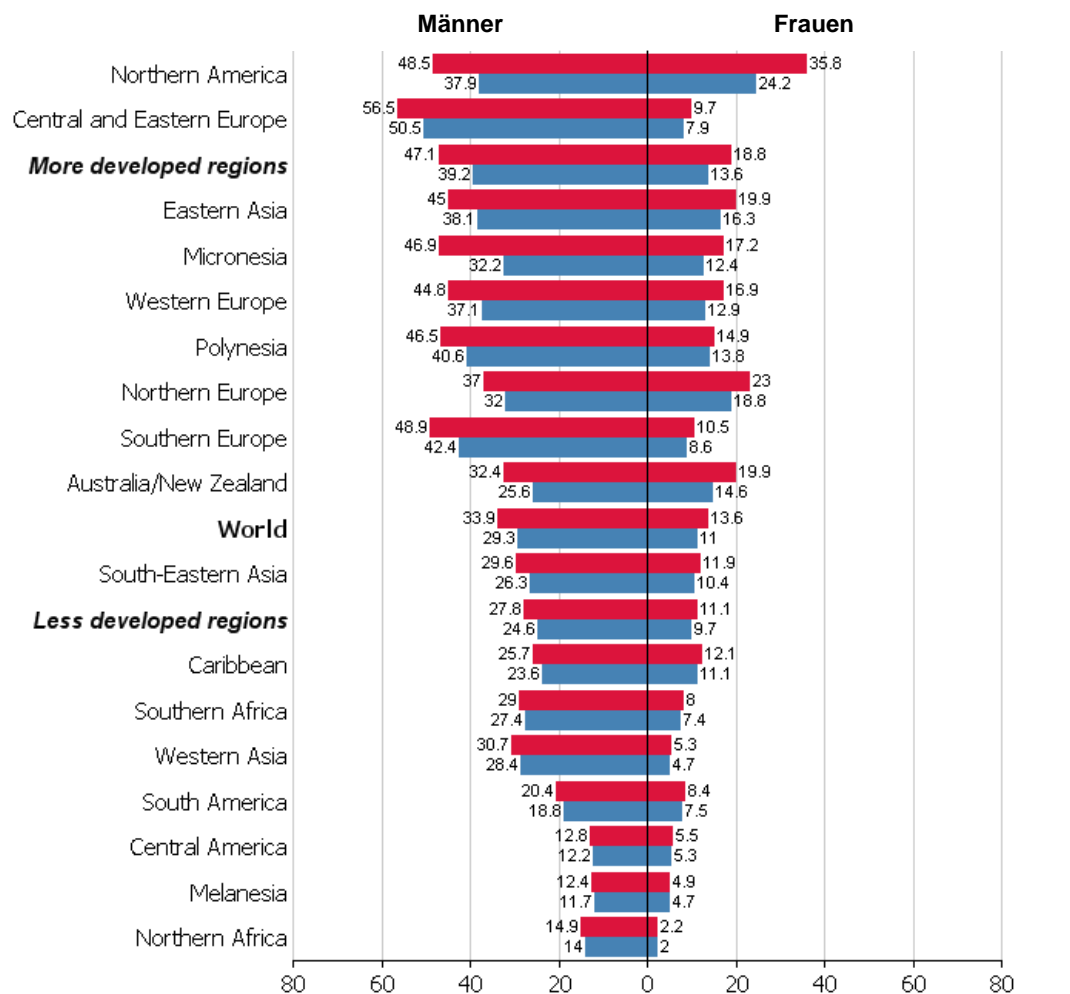


Abbildung 1 Altersstandardisierte Lungenkrebsinzidenz- und -mortalitätsraten (ASR) weltweit, nach Geschlecht und Region. Krebsinzidenz und -mortalität beschreiben die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen an bösartigen Tumoren respektive die Anzahl der jährlichen Todesfälle, die auf diese Erkrankung zurückzuführen sind. Inzidenz- und Mortalitätsraten sind durch eine lange Latenzzeit mit zunehmendem Lebensalter, sich negativ auswirkenden Umweltfaktoren und ungünstigem Lebensstil (krebsförderndes Verhalten) korreliert. Die höchsten Lungenkrebs-Inzidenzen sind in Nordamerika und Europa zu verzeichnen. Die Mortalität ist unter Männern in Zentral- und Osteuropa am höchsten, unter den Frauen dagegen in Nordeuropa, Nordamerika und Australien/Neuseeland. Quelle: GLOBOCAN 2008

■ Inzidenz
■ Mortalität

[7, 8] modif.

1.2 Histologische Klassifikation von Lungenkarzinomen

Lungenkrebs bezeichnet einen epithelialen Tumor, der in den meisten Fällen aus dem Bronchiepithel, vereinzelt auch aus dem Alveolarepithel hervorgeht [9].

Den morphologischen Veränderungen des Lungengewebes geht eine zumeist multikausale molekulare Entartung der Zellen voraus, die sich laut Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zunächst in präinvasiven Läsionen manifestieren [7]. Demgemäß bilden eine Squamöse Dysplasie/Carcinoma in situ, eine Atypische adenomatöse Hyperplasie oder eine Diffuse idiopathische pulmonäre neuroendokrine Zellhyperplasie die Vorstufen zum invasiven Lungenkarzinom, welches sich in **zwei Haupttypen** aufgliedern lässt [6, 9-11]:

1. Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (= NSCLC = non-small cell lung cancer)

- ca. 80 % aller Lungenkreberkrankungen
- 3 Hauptgruppierungen:
 - **Adenokarzinom (= ADC = Adenocarcinoma)**
 - ca. 40 % der NSCLCs
 - azinär, papillär, bronchiolo-alveolär (BAC), muzinös, solide mit Schleimbildung oder gemischte Subtypen
 - **Plattenepithelkarzinom (= SCC = Squamous cell carcinoma)**
 - ca. 40 % der NSCLCs
 - papillär, klarzellig, kleinzellig oder basaloid
 - **großzelliges Bronchialkarzinom (= LCC = Large-cell carcinoma)**
 - großzellig neuroendokrin, kombiniert großzellig, basaloid, lymphoepitheliomartig, klarzellig oder großzellig mit rhabdoidem Phänotyp

2. Kleinzelliges Lungenkarzinom (= SCLC = Small cell lung cancer)

- ca. 20 % aller Lungenkreberkrankungen

Beim Lungenkarzinom handelt es sich hiermit um eine heterogene Erkrankung, deren genaue Bezeichnung nach histopathologischen Merkmalen erfolgt, wobei Mischtypen existieren. Nicht-kleinzelliges und kleinzelliges Lungenkarzinom sowie deren Subtypen unterscheiden sich in erster Linie durch eine differente Morphologie und Wachstumsgeschwindigkeit der Krebszellen, im Metastasierungsmuster und somit auch im Krankheitsverlauf. Die Stadieneinteilung von Lungenkarzinomen erfolgt nach der **TNM-Klassifikation** der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) und bildet die Grundlage für Therapieempfehlungen [6, 10-12].

1.3 Stadien beim Lungenkarzinom

Ausschlaggebend für die Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation sind drei Kriterien:

T („tumour“)	→	Ausdehnung des Primärtumors
N („nodulus“)	→	Fehlen oder Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen
M („metastases“)	→	Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen

Größe oder Ausbreitung des Tumors bzw. der Metastasen werden durch den Zusatz von Ziffern/Buchstaben ausgedrückt:

TX: Primärtumor kann nicht evaluiert werden oder pos. Zytologie
T0: Primärtumor nicht evident
Tis: Carcinoma in situ (aberrante Zellen anwesend)
T1, T2, T3, T4: Größe/Ausdehnung des Primärtumors steigt mit Ziffernhöhe
NX: Befall regionaler Lymphknoten kann nicht evaluiert werden
N0: Befall regionaler Lymphknoten nicht evident
N1, N2, N3: Ausmaß des Befalls von regionalen Lymphknoten steigt mit Ziffernhöhe
MX: Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht evaluiert werden
M0: keine Fernmetastasen
M1: Fernmetastasen vorhanden

Auf Basis dieser Klassifizierung erfolgt für die optimale Therapiewahl sowie zu Prognosezwecken eine Einteilung in vier Tumorstadien [6, 10, 11]. **Stadien I bis III** beschreiben mit ansteigender Ziffer die zunehmende Ausbreitung der Erkrankung. Tumorgroße und/oder Metastasierung in regionalen Lymphknoten werden berücksichtigt. **Stadium IV** beschreibt eine weiter fortgeschrittene Erkrankung mit bereits vorhandenen Fernmetastasen.

Von einer detaillierten Darstellung der Stadieneinteilung wird im Rahmen dieser Arbeit aus Relevanzgründen abgesehen.

Nachdem in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts chirurgischen Behandlungsmethoden noch der Vorzug gegeben wurde, haben sich in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts die Forschung an und Arbeit mit Zytostatika im Bereich der Chemotherapie etabliert. In Kombination mit einer Strahlentherapie können heute sehr gute Behandlungsergebnisse erzielt werden [6, 13]. Dennoch wird Lungenkrebs trotz aller Fortschritte in der Medizin oft erst im fortgeschrittenen Stadium mit demnach mäßigen Heilungsaussichten diagnostiziert [14]. Die **5-Jahres-Überlebensrate** nach Diagnosestellung beträgt bei PatientInnen mit kleinzelligem Lungenkarzinom (nachfolgend als SCLC bezeichnet) weniger als 5 %, bei PatientInnen mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (nachfolgend als NSCLC bezeichnet) durchschnittlich ca. 15 % [15]. Es existieren Zahlen, nach denen Österreichs MedizinerInnen zum heutigen Zeitpunkt einen Heilungserfolg von ca. 75 % (5-Jahres-Überlebensrate) bei NSCLC-PatientInnen im Stadium I der Erkrankung und von ca. 40 % bei Stadium-II-PatientInnen verzeichnen [16]. Während eine vollständige operative Entfernung des Tumors beim SCLC kaum möglich ist und man hierfür die Chemotherapie als bevorzugte Behandlungsmethode wählt, reagiert das weitaus häufiger auftretende NSCLC weniger sensitiv auf chemotherapeutische Anwendungen und steht v.a. bei den Tumorstadien I und II für große Erfolgsaussichten im Falle einer kurativen Resektion [6, 15, 16]. Allerdings sind derartige Pauschalierungen im Einzelfall nicht aussagekräftig, da bei einer Lungenkrebserkrankung immer eine auf die Situation des Patienten/der Patientin abgestimmte Therapiewahl getroffen bzw. diese im Laufe der Behandlung bestmöglich adaptiert wird.

Zudem gewinnt die „**gezielte Krebstherapie**“ (engl.: „targeted therapy“) immer mehr an Bedeutung: Neuartige Arzneistoffe sollen durch ihre spezifische Wirkung auf Krebszellen nur noch minimale Beeinträchtigungen des gesunden Gewebes und somit des gesamten Organismus hervorrufen [13, 14]. Entscheidend hierfür ist allerdings das tiefere Verständnis der vorangehenden molekularen Ereignisse sowie Kenntnis der unterschiedlichen Ursachen einer Krebsentstehung.

1.4 Ätiologie des Lungenkarzinoms

Mit heutigem Wissensstand kann eine Einschätzung über die vermuteten bzw. nachgewiesenen exogenen Faktoren einer Lungenkrebserkrankung abgegeben werden. Ausschlaggebend sind in diesem Zusammenhang aktiver Tabakkonsum bzw. Passivrauchen (zu 80-90 %), berufsbedingte Schadstoffe (5 %), Radonbelastung (2-4 %) sowie Luftschadstoffbelastungen, im besonderen Dieselruß. Darüber hinaus spielt aber auch die familiäre Prädisposition eine gewisse Rolle [6, 13].

1.4.1 Tabakrauch

Es ist evident, dass Rauchen, primär von Zigaretten, den Hauptgrund bei der Entstehung von Lungenkrebs darstellt [17]. Umfassende epidemiologische Studien hierüber werden bereits seit den 1950er Jahren durchgeführt. An der von 1951 bis 2001 angelegten British Doctors Study (Britische Ärzte Studie) etwa beteiligten sich ein Großteil der männlichen Ärzte Großbritanniens. Diese Langzeitstudie ergab bereits 1956 einen Zusammenhang zwischen Tabakrauchen und Erhöhung des Lungenkrebsrisikos und hat wesentlich zur Sensitivierung der Forschungswelt für dieses Gebiet beigetragen [18-20].

Bei über 80 % aller LungenkrebspatientInnen weltweit handelt es sich um aktive oder ehemalige RaucherInnen, wobei weitere geschätzte 6-7 % aller nicht rauchenden PatientInnen eine/n rauchende/n LebenspartnerIn oder Elternteil haben. Passivrauch am Arbeitsplatz erhöht das Lungenkrebsrisiko von NichtraucherInnen um geschätzte 12-19 %, LebenspartnerInnen von RaucherInnen tragen ein um 20 % (Frauen) bis 30 % (Männer) erhöhtes Risiko [17, 21].

Generell ist festzuhalten, dass in den vergangenen Jahrzehnten tendenziell eine rückläufige Inzidenz sowie ein Rückgang an Lungenkrebs-Todesfällen bei Männern in vielen Industrieländern festzustellen sind, dem jedoch eine steigende oder stagnierende Lungenkrebsinzidenz- sowie -mortalitätsrate der weiblichen Bevölkerung in vielen dieser Länder gegenüber steht. Ebenso in großem Ausmaß dem verstärkten Tabakkonsum zugrunde liegt die deutliche Zunahme an LungenkrebspatientInnen in einigen Entwicklungsländern. Die erst in den vergangenen Jahren zunehmende Anzahl an rauchenden Personen in vielen afrikanischen und asiatischen Ländern wie z.B. China, Korea und Indien sorgt, speziell auch bei Frauen, für einen Anstieg der Lungenkrebserkrankungen in diesen Regionen [2, 22-30].

Zuletzt rauchten ca. ein Viertel der Männer (28 %) und ein Fünftel der Frauen (19 %) Österreichs im Alter ab 15 Jahren täglich. Synchron zur steigenden Inzidenz an Lungenkrebs-Neuerkrankungen und -Sterbefällen bei österreichischen Frauen konnte in den letzten Jahren ein kontinuierlicher Anstieg an Raucherinnen bei gleichzeitigem Rückgang an männlichen Rauchern festgestellt werden [5, 25].

Tabakrauchen trägt zur Entstehung aller histologischer Subtypen von Lungenkarzinomen bei, wird jedoch am stärksten mit Plattenepithelkarzinomen und SCLCs in Verbindung gebracht [14, 17, 31]. Aerosol (bestehend aus einer Gas- und einer Partikelphase) in Form von Zigarettenrauch enthält insgesamt ca. 10^{10} Partikel/ml und etwa 4.800 Komponenten, von denen 69 kanzerogen und einige weitere co-kanzerogen wirken. Potentiell krebserregende Inhaltsstoffe in der Gasphase sind Stickoxide, 1,3-Butadien, Benzen, Isopren, Styren, Acetaldehyd, Ethylenoxid, Formaldehyd, Acrolein und Furan, aber auch Metalle wie Cadmium, Chrom, Nickel und Polonium 210 [32-34]. Die drei wichtigsten Klassen von **Karzinogenen** in der aus zumindest 3.500 Komponenten bestehenden Partikelphase bilden hingegen **polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe** (Abk.: **PAK** bzw. **PAH** für „polycyclic aromatic hydrocarbons“) und **N-Nitrosamine** (R_1R_2N-NO ; „R“ steht für Alkyl- oder Arylgruppen) als Nikotin-Derivate, aber auch **aromatische Amine** wie Hydroxylamin (H_3NO) [34-36].

Tabakspezifische Karzinogene sind aufgrund **metabolischer Aktivierungsvorgänge**, im Zuge derer die nicht-reaktiven Stoffe in eine in die DNA interkalierende Form umgewandelt werden können, in großer Zahl kanzerogen [37, 38].

Zu den wichtigsten dieser Karzinogene zählt der im Körper umgesetzte PAK **Benzo[α]pyren (BaP)** bzw. dessen Metabolit **BPDE** (Benzo[α]pyren-7,8-dihydroxy-9,10-Epoxid, siehe Abb. 2) [37].

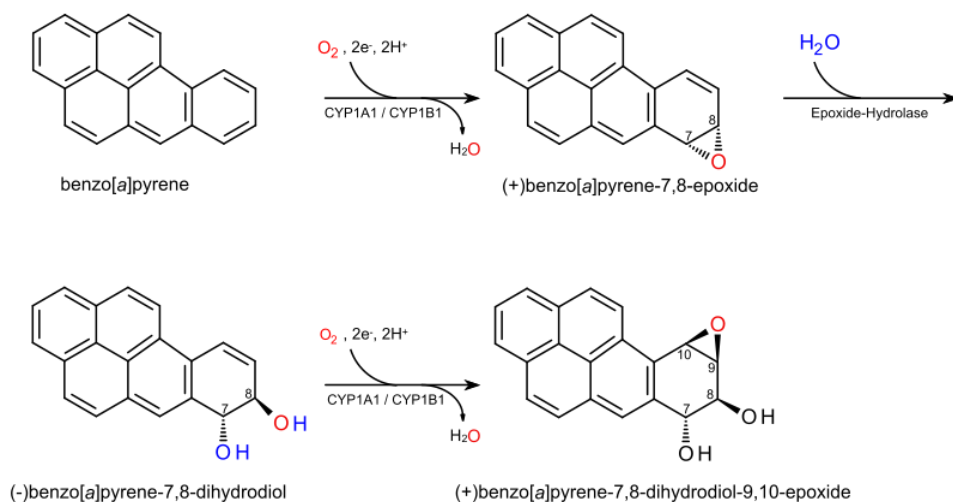


Abbildung 2 Enzymatische Transformation von Benzo[α]pyren (BaP) zum kanzerogenen Benzo[α]pyren-7,8-dihydroxy-9,10-Epoxid (BPDE). Der polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff Benzo[α]pyren wird durch die Monooxygenasen CYP1A1 und CYP1B1 aus der Cytochrom-P450-Familie zu Benzo[α]pyren-7,8-Epoxid umgewandelt, weiter in 7,8-Dihydroxybenzo[α]pyren hydrolisiert und anschließend an Position 9 nochmals zu BaP-7,8-diol-9,10-Epoxid (BPDE) epoxidiert.

[39]

Das Ausgangsprodukt **BaP** wird als Fremdstoff zunächst u.a. durch **Cytochrom-P450-Enzyme** oxidiert, um die Wasserlöslichkeit zum Zwecke der Exkretion zu erhöhen [39, 40]. In einem weiteren Detoxifizierungsschritt durch Glutathion-S-Transferasen (**GSTs**), Uridin-5'-diphosphat-glucuronosyl-Transferasen (**UGTs**), N-Acetyl-Transferasen (**NATs**), Sulfatasen und weiteren Phase-II-Enzymen werden die Zwischenprodukte in eine stark wasserlösliche Form umgewandelt, um die Ausscheidung für den Körper toxischer Stoffe zusätzlich zu protegieren [41-44]

Erweisen sich die aus der Reaktion zwischen nicht-reaktiven Karzinogenen und CytP450-Enzymen hervorgegangenen Zwischenprodukte mit ihrem für gewöhnlich elektrophilen Zentrum jedoch als hochreaktiv oder können sie durch verminderte Glutathiontransferaseaktivität nicht ausreichend umgewandelt werden, binden sie wie **BPDE** als karzinogene Metaboliten an die N²-Position von Desoxyguanosin (siehe Abb. 3). Eine derartige metabolische Aktivierung mittels Bildung von **DNA-Addukten** verursacht genetische Aberrationen und steht, wie es scheint, am Beginn vieler kanzerogener Prozesse [13, 45, 46]. Auch wurden unter den P450-Enzymen und GSTs Polymorphismen entdeckt, die mit einem erhöhten respektive niedrigeren Lungenkrebsrisiko korrelieren [47, 48].

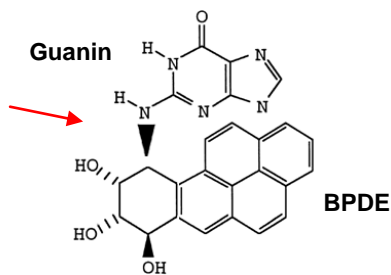


Abbildung 3 DNA-Addukt BaP-7,8-diol-9,10-Epoxid.

BPDE bindet im Zuge der metabolischen Aktivierung mit der C-10-Position kovalent an die N²-Aminogruppe der Base Guanin. Dies führt zu Änderungen in der Chromatinstruktur und zieht mitunter mutagene Ereignisse nach sich.

[49]

Nikotin selbst ist, wenn auch suchterzeugend, an sich nicht krebserregend, bringt allerdings im Zuge von Toxifikationsprozessen verschiedene tabakspezifische *N*-Nitrosamine und somit andersartige, ebenfalls mit der DNA interagierende Addukte hervor, die kanzerogen wirken können. Dazu gehören das, vorwiegend Adenokarzinomen hervorrufende, 4-(Methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (engl.: "nicotine-derived nitrosamine ketone" oder **NNK**), aktiviert durch CYP2A6 und unter Umständen zu **NNAL** reduziert, wie auch das pulmonale Karzinogen **N'-Nitrosonornikotin (NNN)** (siehe Abb. 4) [36, 50, 51].

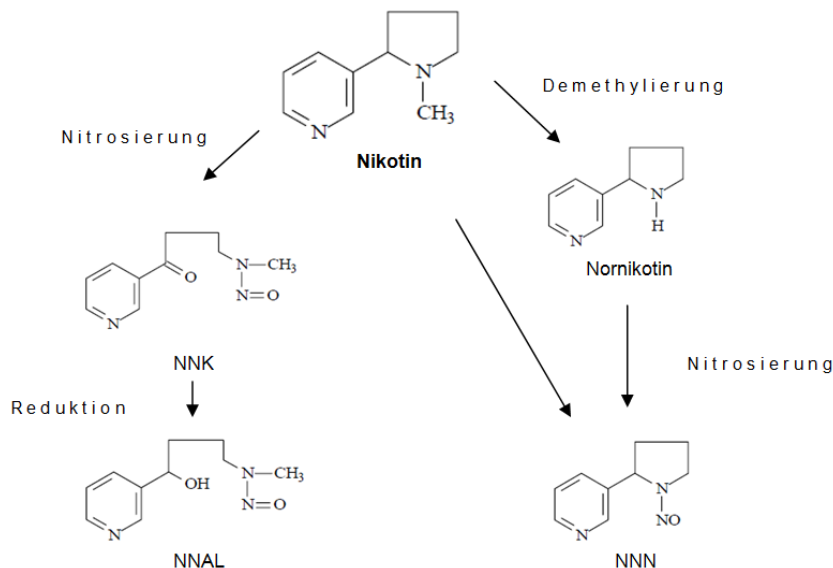


Abbildung 4 Chemische Umwandlung von Nikotin in seine kanzerogenen *N*-Nitrosamine am Beispiel von NNK und NNN. Nikotin wird während des Abbauprozesses im Körper durch Nitrosierung ua in 4-(Methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und durch α -Hydroxylierung des in der Nähe zur *N*-Nitrosogruppe befindlichen Kohlenstoffs in seinen Hauptmetaboliten 4-(Methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) umgesetzt. N'-Nitrosonornikotin (NNN) ist ein weiteres, über Nitrosierung aus Nikotin hervorgehendes, tabakspezifisches Nitrosamin.

[36, 51, 52] modif.

Zu den häufigsten von Nitrosaminen ausgehenden Läsionen zählen die hochmutagenen Alkylierungsreaktionen an der O⁶-Position von Guanin (siehe Abb. 5) [53].

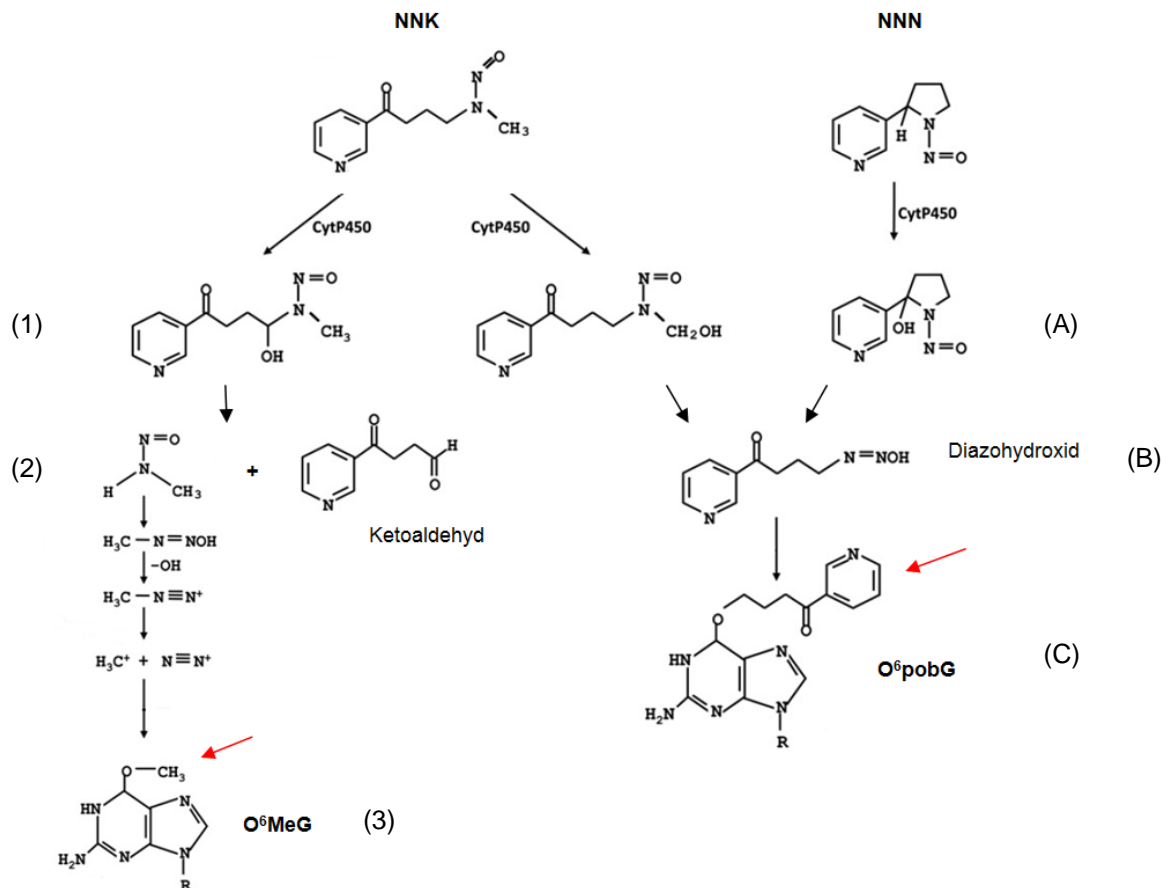


Abbildung 5 Beispiel für die Formation von Methyl- und Pyridyloxobutyl-Addukten durch NNK und NNN. NNK wird über Methylen-Hydroxylierung (1) zu Methyl-diazohydroxid und das Ketoaldehyd 4-Oxo-4-(3-pyridyl)-butanal umgewandelt (2) und führt schließlich zur Formation des mutagenen Methyladdukts O⁶-Methyl-guanin (O⁶MeG) (3). Aus methyl-hydroxyliertem NNK und 2'-hydroxyliertem NNN hingegen (A) gehen 4-(3-Pyridyl)-4-oxobutyl-Diazohydroxide hervor (B) und führen zur Bildung von O⁶ [4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]-Guanin (O⁶pobG) (C). Weitere reaktive Stoffwechselprodukte aus Nitrosaminen sind z.B. O⁴-Methylthymine (O⁴-MeT) und 7-Methylguanin (nicht abgebildet).

[46, 50, 53-55] modif.

Derartige kanzerogene Metaboliten tragen in Form von DNA-Addukten massiv zur Akkumulation von die Lungenkrebsentstehung begünstigenden genetischen Veränderungen bei [56-58]. Unter rauchenden LungenkrebspatientInnen wurde ein hohes Maß an Genkopienzahl-Veränderungen (Deletionen, Amplifikationen) bemerkt. Bei den durch Tabakrauch beeinträchtigten Regionen im Genom handelt es sich um Gene, die in erster Linie eine Rolle bei Zellzyklusvorgängen, der Chromosomensegregation oder der Methylierung von DNA spielen [59]. Tabak-induzierte Karzinogene und die dadurch hervorgerufenen Mutationen werden von verschiedenen Faktoren beeinflusst: Von der Art des DNA-Addukts, der Sequenz-Umgebung, dem Ausmaß der Reparaturmechanismen sowie von den Aktivitäten der DNA-Polymerasen [46].

Als vorrangiges Ziel binden die Tabak assoziierten Metaboliten wie BPDE an die für Mutationen im NSCLC bekannten Hotspots des Tumorsuppressorgens **TP53** (Protein: p53) (Chromosom 17p, Codons 157, 248 und 273). TP53 spielt bei der Regulation von Zellproliferation und Apoptose eine entscheidende Rolle (siehe auch 1.5.3). Die Addukte wählen hierfür die mit einem zumeist

methylierten Cytosin ausgestatteten und somit Guaninalkylierung begünstigenden 5'-CpG-3'-Regionen. In 30 % der RaucherInnen mit einem Lungenkarzinom wird in weiterer Folge Guanin zu Thymin transvertiert und zeigt damit ein deutlich unterschiedliches Mutationsprofil zu jenem von NichtraucherInnen, bei denen signifikant weniger **G→T-Transversionen** (12 %) stattfinden, G→A-Transitionen in CpG-reichen Regionen hingegen vermehrt vorkommen (47 % im Vergleich zu 29 % bei RaucherInnen) [34, 60-63].

Ebenso häufige tabakassoziierte Mutationen finden in den Tumorsuppressorgen **p16** und **FHIT** (Zellzyklus-Regulation), in den Proto-Onkogenen **KRAS** (Zellwachstum und -differenzierung) und **BCL-2** (Regulierung der Apoptose) sowie in dem durch Degradation von β -Catenin an der Wnt-Signaltransduktion und somit Regulierung der Zellzyklusprogression beteiligten **APC**-Gen statt [36, 64-71]. Der Level an DNA-Addukten ist bei RaucherInnen signifikant höher als bei NichtraucherInnen, wobei Frauen ein größeres Risiko tragen, an tabakinduziertem Lungenkrebs zu erkranken. Die Ursache liegt vermutlich in genetischen und hormonellen Unterschieden begründet. Zum einen verläuft der Nikotinmetabolismus von Frauen anders als jener von Männern und die Suszeptibilität gegenüber DNA-Schädigungen durch PAK-Metaboliten ist different, zum anderen finden sich in Zellen von Raucherinnen mehr TP53- und KRAS-Mutationen als bei männlichen Rauchern [72-75].

Aufgrund der durch (Passiv)Rauchen inhalierten toxischen Substanzen ist das Lungenkrebsrisiko in erster Linie von der Gesamtdauer des Tabakrauchens und dem Alter bei Initiation, von der Anzahl und Art der täglich konsumierten Tabakwaren und im Speziellen von der Tiefe der Inhalation abhängig [14, 76]. Die aktuell in den „westlichen“ Industrienationen erhältlichen, mit Filtern ausgestatteten Zigaretten enthalten weniger Nikotin, Teer und weniger polyzyklische Kohlenwasserstoffe, dafür mehr tabakspezifische Nitrosamine als Zigaretten anderer Herkunft oder früherer Zeiten [77-79].

Beendigung des Tabakkonsums stoppt den weiteren Anstieg des Lungenkrebsrisikos zu jeder Zeit, wobei das Risiko einer Erkrankung nach 10 Jahren ohne aktives Rauchen erst auf ein Viertel des vorherigen Werts gesunken ist [17]. Grund hierfür sind die mit dem Tabakkonsum in Zusammenhang stehenden unterschiedlichen Expressionslevels der Gene, die nach Ende des Tabakkonsums zum Teil auf das Niveau der Expressionsmuster von NichtraucherInnen zurückfinden, während andere nachhaltig verändert bleiben [80]. Unter LungenkrebspatientInnen befinden sich somit auch auffällig viele ehemalige RaucherInnen [81]. Pfeifen- und ZigarrenraucherInnen tragen generell ein etwas niedrigeres Lungenkrebsrisiko als ZigarettenraucherInnen, was mutmaßlich in der geringeren Inhalationstiefe begründet liegt [17].

Variationen hinsichtlich der Lungenkrebsarten und -raten, globale und geschlechtsspezifische Unterschiede sowie die Tatsache, dass „nur“ 10-20 % aller RaucherInnen tatsächlich Lungenkrebs entwickeln, lassen darauf schließen, dass zum einen DNA-Reparaturmechanismen sowie Detoxifizierungspotential im Wechselspiel mit der metabolischen Aktivierung individuell höchst unterschiedlich wirken, weisen aber gleichzeitig auf weitere Einflussfaktoren hinsichtlich des Lungenkrebsrisikos hin [72, 82].

1.4.2 Weitere Risikofaktoren für Lungenkrebsentstehung

Geschätzte 5 % der Lungenkarzinome sind **berufsbedingten Schadstoffen** wie Asbest, Chrom, Nickel und Arsen zuzuschreiben [13]. Im Jahr 2009 wurden mehr als die Hälfte der Todesfälle infolge einer Berufskrankheit in Österreich auf eine Lungenkrebserkrankung durch **Asbest** zurückgeführt, der Aberrationen am Chromosom 19 verursacht [5, 83]. 2-4 % aller Lungenkrebs-Erkrankungen stehen in Zusammenhang mit einer erhöhten **Radonbelastung**, wobei der Prozentsatz länderspezifisch auf bis zu 14 % zu erhöhen ist [13, 84]. Das in der Umwelt natürlich vorkommende, radioaktive Edelgas wird mit der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *p16* durch Methylierung in Verbindung gebracht [85]. Weitere **Umweltschadstoffe** wie Dieselruß, Schwermetalle wie Arsen, Kadmium und Feinstaub, aber auch Vinylchloride sorgen vorwiegend in außereuropäischen Ländern für Belastungen in der Luft und der Lebensumgebung [9, 13, 86]. Die hohen Lungenkrebsraten chinesischer Frauen sind unter anderen (Abgase in Innenräumen durch Kohleöfen und Kochen) auf diese Faktoren zurückzuführen [27, 87, 88]. **Hormonelle Faktoren:** Östrogenrezeptoren und Katecholestrogene als deren Metaboliten spielen vermutlich eine Rolle bei vermehrter Zellproliferation und dem Tumorwachstum bei Frauen. Die Hormone werden im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe verstärkt exprimiert [89, 90]. Einen Einfluss auf die Karzinogenese im Lungengewebe könnten auch humane **Papillomaviren (HPV)** haben, speziell die HPV-Serotypen 16 und 18 [91, 92]. Die Onkogene *E6* und *E7* sind für die Immortalisierung der Zellen in humanen Trachealepithelzellen verantwortlich [93].

Nicht zuletzt spielt auch die **familiäre, genetische Prädisposition** eine Rolle [16, 17]. Personen mit positiver Familienhistorie (Verwandte ersten Grades sind an Lungenkrebs erkrankt) tragen ein zweifach erhöhtes Risiko, selbst am Lungenkarzinom zu erkranken [94]. Des Weiteren ergaben Studien unter NichtraucherInnen, dass vor allem Adenokarzinome und die jüngere Altersgruppe von 40 bis 59 mit einer erhöhten familiären Prädisposition assoziiert werden können [95, 96]. Keimbahnmutationen in *TP53*, *RB1* und *EGFR* sind neben Variationen von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs: „single nucleotide polymorphisms“) auf Chromosom 15 (15q24-15q25.1) nur einige Beispiele, warum auch bei NichtraucherInnen, insbesondere aber in Kombination mit Tabakrauchen, eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Lungenkarzinomen vorliegen kann [97-103].

1.5 Molekulare Mechanismen der Krebsentstehung

Die Lungenkarzinogenese verläuft über geschätzte 10 bis 20 Jahre und beschreibt multiple molekulare Veränderungen, die gleichzeitig an unterschiedlichen Stellen des Respirationstrakts auftreten können. Dieses Phänomen wird als zuerst im Jahr 1953 von Slaughter et al. beschriebene „**Feldkanzerisierung**“ bezeichnet [104-109].

Definition nach Altmeyer et al.: „*‘Feldkanzerisierung’ beschreibt die Existenz von präneoplastischen Prozessen mit hoher karzinogener Potenz an mehreren Stellen eines Areals (‘Feld’). Man geht davon aus, dass die präneoplastischen Prozesse sich in unterschiedlichen ‘Reifestadien’ befinden und je nach Stimulation ihre individuelle maligne Entartung beschleunigen können.*“ [110].

Veränderungen im Genexpressionsmuster der Zellen, die zu Krebsentstehung führen, betreffen in erster Linie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die Aktivierung von (Proto)Onkogenen und die Deregulation der Zellproliferation und Apoptose. Charakteristisch sind weiters Angiogenesevorgänge und Metastasenbildung infolge anhaltender Zellmigration und -invasion [111-114].

Tumorgewebe besteht aus unterschiedlichen Zelltypen, die neuesten Erkenntnissen zufolge vermutlich auch klonale Regionen beherbergen. Letztere enthalten ca. 40.000 - 360.000 klonal verwandte Zellen mit (epi)genetischen Veränderungen und entstehen durch kumulative Schädigungen von Stammzellen im Lungengewebe. Dabei dürften onkogenes *KRAS*, *PTEN* sowie dessen Gegenspieler PI3K (siehe auch 1.5.1.1) eine zentrale Rolle bei der darauffolgenden Aktivierung, Proliferation und Expansion von gegenüber medikamentösen Therapien schädigungsresistenten **bronchoalveolären Stammzellen** spielen. Deren Bedeutung als mutmaßliche Krebsstammzellen wird derzeit mittels Mausmodellen näher erforscht [113, 115-120]. Es wurde festgestellt, dass sich klonale Regionen auch in normalem Gewebe, das von nicht-kleinzelligen Lungentumoren umgeben ist, befinden, und je nach Art und Größe zum Lungenkrebsrisiko beitragen können [111, 114, 121].

Karzinome können bereits aus einer geringen Anzahl an Störungen im Genom oder Epigenom hervorgehen [122]. Es gibt Tumore, die nach heutigem Wissensstand von einer einzigen Schädigung ausgehen (nach **Knudson**: „one hit“) – z.B. die Chronisch myeloische Leukämie (CML), deren Ursache eine frühe Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 ist („Philadelphia-Chromosom“). In einer Mehrzahl der Fälle ist jedoch davon auszugehen, dass einer Karzinogenese zwei oder mehrere (Epi)Mutationen zugrunde liegen: Trotz Inaktivierung eines Allels (durch Mutation oder Promoter-Hypermethylierung) kann die Funktion des Gens aufrecht erhalten werden, solange das zweite Allel noch funktionsfähig ist. Führt allerdings ein weiterer Defekt zur Inaktivierung des zweiten Allels, so kommt es zu einem tatsächlichen Funktionsverlust (**LOH = loss of heterozygosity**) des betroffenen Gens [122, 123]. Der erste „hit“ kann erblich bedingt sein oder aber beide Ereignisse finden in somatischen Zellen statt („**two-hit-Hypothese**“ nach Knudson) [124-126]. Inaktivierende Veränderungen in tumorwirksamen Genen können durch Mutationen oder durch aberrante DNA-Methylierungen verursacht werden (siehe 2.1).

Loss of heterozygosity (LOH) beim NSCLC: Mit ca. 80 % am häufigsten und sehr früh in der Pathogenese des NSCLC finden LOH-Ereignisse am **Chromosom 3p** statt. In dieser Region sind einige Tumorsuppressorgene wie *RARβ* (Kontrolle des Zellwachstums), *RASSF1A* und *FHIT* (proapoptotische Effekte) oder das DNA-Reparaturgen *hMLH1* lokalisiert, deren LOH in einer Hyperplasie resultieren [36, 66, 105, 112, 127-131]. Funktionsverluste von Genen auf dem kurzen Arm des **Chromosoms 9** betreffen in über 70 % der NSCLC-Fälle den Zellzyklusregulator *p16*. Auch LOH von *p15* auf Locus 9p führt zu instabiler Wachstumsregulierung und somit Tumorprogression [14, 15]. Besondere Aufmerksamkeit in der Krebsforschung kommt ebenso den Aberrationen auf den Chromosomen **13q** (*Rb*-Locus) und **17p** (*TP53*-Locus) sowie bestimmten Loci der **Chromosomen 6, 7 und 8** zu, die in ca. 50 % der NSCLC-Fälle von Allelverlusten betroffen sind [15, 132-134].

Der oft bedeutsame Funktionsverlust eines Gens führt zu malignen Zelltransformationen, wobei Anzahl und Muster der beteiligten Gene je nach Individuum und Art des Lungenkarzinoms differieren. So wurde festgestellt, dass die LOH-Muster nach Rauchgewohnheiten sowie in SCCs und ADCs unterschiedlich sind [31]. Weiters korreliert eine höhere Frequenz an LOH-Ereignissen in ADCs mit wenig differenzierten Karzinomen im Vergleich zu einer niedrigeren LOH-Rate bei stärker differenzierten Karzinomen [135].

Im Zusammenhang mit (epi)mutagenen Ereignissen in (potentiellen) Krebszellen wurde auch der Begriff der **genomischen Instabilität** geprägt. Sie generiert Zufallsmutationen und chromosomale Umlagerungen oder wird durch epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung und Histonmodifikationen herbeigeführt [136, 137]. Ein Sonderfall der genetischen Instabilität stellt die **Mikrosatelliteninstabilität** (MSI) dar, die durch eine hohe Mutationsrate innerhalb sich über das Genom verbreiteter repetitiver Sequenzen ausgelöst wird und somit Sequenzänderungen bzw. Längenpolymorphismen im Genom nach sich zieht. Sie wird durch Defekte in DNA-Reparaturgenen wie *hMLH1* oder *hMSH2* verursacht und begünstigt Tumorwachstum (siehe auch 1.5.3) [138-140]. MSI wird in 29-58 % der NSCLC-Erkrankungen beobachtet [132].

1.5.1 Schlüsselereignisse der Tumorigenese

Durchlaufen normale, „gesunde“ Zellen untypische molekulare Veränderungen, formieren sie um sich herum tumorassoziiertes Stroma, zum größten Teil bestehend aus für die Synthese der extrazellulären Matrix (ECM) wichtigen Fibroblasten. In der Folge bildet sich das sogenannte **Tumor-Mikromilieu** („tumor microenvironment“), das in den meisten Fällen durch lokal und zeitlich heterogene Versorgung, Hypoxie (Sauerstoffmangel), Gewebeazidose (Absinken des pH-Wertes im Blut durch Störung des Säure-Basen-Haushalts), abnormale Vaskularisierung und Mikrozirkulation sowie durch Laktat-Akkumulation infolge erhöhter Tumorglykolyse-Tätigkeit gekennzeichnet ist [114, 141].

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Neoplasien, fortschreitendem Tumorwachstum und Metastasierung spielen die unzähligen intra- und interzellulären Signalströme zwischen den Karzinomzellen des Parenchyms und den Stromazellen, die sich im Laufe der Tumorprogression ständig ändern [114, 141].

Hanahan und Weinberg proklamieren die nachfolgenden Merkmale als **Schlüsselereignisse bei der Tumorentstehung** [113, 114]:

- Aufrechterhaltung der Proliferation
- Evasion von Wachstumssuppressoren
- Verhinderung des Zelltods
- Replikative Immortalität
- Angiogenese
- Aktivierung von Invasionen und metastatische Dissemination

1.5.1.1 Aufrechterhaltung der Proliferation



Für die Homöostase von Zellzahl und -funktion sowie die Beibehaltung einer normalen Gewebearchitektur in gesundem Gewebe ist eine funktionierende **Zellzykluskontrolle** ausschlaggebend. Wichtige Zellzyklusproteine sind cyclinabhängige Kinasen (**CDKs**), die über Komplexbildung mit Cyclinen andere in die Zellzyklusregulation involvierte Enzyme phosphorylieren und so zur Steuerung des Zellzyklus beitragen. Eine Störung des Tumorsuppressorgens **RB** etwa, das bei normaler Funktion den Eintritt der Zelle in die Synthese-Phase verhindern kann, führt zu beschleunigtem Zellwachstum, wenn das Retinoblastom-Protein (pRB) von CDKs und assoziierten Cyclinen phosphoryliert und auf diese Weise inaktiviert wird. Einfluss auf diesen Vorgang nehmen weitere Tumorsuppressorgene wie der CDK-Inhibitor *p16* [114, 142].

Das Gleichgewicht zwischen Produktion/Aktivität von wachstumsfördernden Signalen und Arretierung bzw. Einleitung der Apoptose gerät in Karzinomzellen aus dem Lot. Maßgeblich an der Deregulation beteiligt sind daher die in der Zellmembran lokalisierten Wachstumsfaktor-Rezeptoren bzw. deren Liganden. Zu letzteren zählen **Wachstumsfaktoren** wie **EGF, FGF und IGF** [142-144]. Erhöhte Anzahl an und Strukturänderungen von Rezeptormolekülen mit ihren Tyrosinkinase-Domänen an der Zelloberfläche begünstigen anhaltende Zellproliferation ebenso wie eine proliferative Stimulation der Krebszellen durch eigenständige Ligandenproduktion und Expression der passenden Rezeptoren. Deren Überexpression führt über den Zellzyklus auch in normalen Zellen innerhalb tumorassozierten Stromas zu verstärktem Wachstum der Zellzahl und -größe [114, 145].

Durch die Signalkaskade zugunsten gesteigerter Proliferationsvorgänge werden im Normalgewebe **Ras-Gene** aktiviert, die mit ihrer GTPase-Aktivität dafür sorgen, dass es sich um vorübergehende Proliferationsereignisse handelt. Kann GTP allerdings aufgrund onkogener (Epi)Mutationen nicht zu GDP hydrolysiert werden, kommt es zur Anreicherung von aktivem Ras und somit zu unkontrollierten wachstumsstimulierenden Signalen (siehe auch 1.5.1.5) [114].

Veränderungen beim NSCLC: Zur HER/ErbB-Familie gehören vier Rezeptor-Tyrosinkinasen, die mit ihren Liganden die intrazellulären Signaltransduktionswege kontrollieren und an der Regulierung verschiedener Proliferations-, Invasions- und Apoptoseprozesse sowie an Angiogenesevorgängen und Metastasierung beteiligt sind [146]. Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor **EGFR/HER1**, dessen Aktivität in malignen NSCLC-Zellen oftmals dereguliert ist. Zum einen wird **EGFR** in 32-47 % der NSCLCs überexprimiert, zum anderen sind Mutationen dieses Gens bekannt, die beim NSCLC von klinischer Relevanz sind [31, 111, 147-151]. **EGFR**-Mutationen werden in verstärktem Ausmaß bei weiblichen Personen, NichtraucherInnen und bei der ostasiatischen Bevölkerung (JapanerInnen) sowie in Adenokarzinomen vorgefunden [152]. 90 % der **EGFR**-Mutationen betreffen eine Punktmutation im L858R-Allel (Exon 21) oder Deletionen in Exon 19 [153]. In selteneren Fällen sind auch Amplifikationen (Erhöhung der Genkopienzahl) oder eine veränderte Ligandenexpression die Ursache für maligne Veränderungen [154]. Vermehrt Mutationen/Amplifikationen konnten bei NSCLC-PatientInnen auch im Protoonkogen **HER2/neu/cErbB-2** entdeckt werden. Weiters entsteht bei NSCLC-PatientInnen vielfach die Fusionstyrosinkinase **EML4-ALK** durch die Fusion der Gene **EML4** und **ALK** [155-158]. Durch

derartige Veränderungen der Rezeptor-Tyrosinkinasen erfolgt eine Aktivierung nachgeschalteter Signalwege wie PI3K-AKT und MAPK-ERK, die Tumorentstehung induzieren. Mittels Rekrutierung von Signalmolekülen wie AKT (PKB), PI3K oder mTOR wird das Zellwachstum stimuliert. Der Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens **PTEN**, welches PIP₃, das Substrat von PI3K, deaktiviert, regt das **EGFR**-Signal an und verstärkt so die onkogene Wirkung [159, 160]. Bei der Behandlung von NSCLC-PatientInnen mit **EGFR**-Tyrosinkinase-Inhibitoren sprechen 70-80 % der PatientInnen mit **EGFR**-Mutationen auf die Therapie an [161].

Darüber hinausgehend wurde eine eingeschränkte Proteinexpression des CDK-Inhibitors **p16** in NSCLCs aufgrund von Hypermethylierung anhand zahlreicher Studien sowie damit zusammenhängende schlechtere Überlebenschancen bei NSCLC-PatientInnen nachgewiesen [132, 162, 163]. Weiters ist das an der Steuerung von Zellwachstum und -differenzierung beteiligte **KRAS**, dessen Funktionsverlust u.a. mit der Inaktivierung von **p16**, **TP53**, **BCL-2** und **RASSF1** in Zusammenhang gebracht wird, in 20-40 % der NSCLCs dereguliert. Mutationen im **KRAS**-Gen (Codon 12) wurden ebenfalls vorwiegend beim ADC festgestellt [68, 69, 164]. Anzumerken ist außerdem, dass Mutationen in **KRAS** nicht gemeinsam mit **EGFR**-Mutationen und **ALK**-Translokationen auftreten [165].

1.5.1.2 Evasion von Wachstumssuppressoren

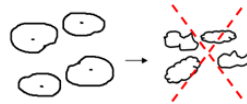


Einen wesentlichen Beitrag zur Deregulierung von Zellwachstum und Proliferation tragen neben weiteren die Tumorsuppressorgene **RB** und **TP53**. Sie sind wichtige Kontrollstellen innerhalb großer Netzwerke und tragen Anteil am weiteren Schicksal gesunder wie geschädigter Zellen, indem sie wachstumsinhibierende Signale überwiegend von außerhalb der Zelle übertragen (**RB**) oder intrazellulären Stress und Abnormalitäten detektieren (**TP53**), um uneingeschränktem Zellwachstum Einhalt zu gebieten. Somatische (Epi)Mutationen in eben solchen Genen führen zu verstärkter Proliferation und haben fatale Folgen hinsichtlich einer Tumorentstehung (siehe auch 1.5.3) [114, 166]. In gesundem Gewebe sorgen die Zell-Zell-Kontakte normaler Zellen untereinander für eine Unterdrückung der weiteren Zellproliferation. Das Zelloberflächen-Adhäsions-Molekül **E-Cadherin** (**CDH1**) dient u.a. als Mediator dieser kontaktinduzierten Beendigung der Proliferationsprozesse und erleidet in Krebszellen oft den Verlust seiner Funktion (siehe auch 1.5.1.6). Reguliert wird seine Expression u.a. vom Wachstumsfaktor **TGF-β**, der, mit p53 in Wechselwirkung stehend, zunächst als Tumorsuppressor in Erscheinung tritt, aber im Laufe der Tumورprogression, z.B. durch Mutation von **TP53**, die Zellproliferation vorantreiben kann. So wird durch Umgehung des antiproliferativen Effekts von TGF-β malignes Verhalten der Zellen begünstigt [114, 167, 168].

Veränderungen beim NSCLC:

Auswirkungen auf die Signalstärke von TGF-β hat der thyroideale Transkriptionsfaktor 1 (**TTF1**). Er kann die Wirkung von TGF-β abschwächen und so die Zellmigration und -invasion supprimieren [169]. **TTF1** wird vorwiegend in ADCs exprimiert. Ein Funktionsverlust des Gens korreliert mit aggressivem Verhalten in NSCLCs und stellt einen guten prognostischen Marker bei NSCLC-PatientInnen [170]. **CDH1** ist in 18-58 % der NSCLC-PatientInnen methyliert, was mit einer schlechten Prognose assoziiert wird [171].

1.5.1.3 Verhinderung des Zelltods



Die Regulierung der Apoptose erfolgt sowohl über ein intrinsisches Programm, das die Signale intrazellulären Ursprungs überwacht, als auch über ein extrinsisches Programm mit seinen **Fas**-Liganden und -Rezeptoren (Fettsäure-Synthase), das Signalabläufe von außerhalb der Zelle kontrolliert. Bei zellschädigenden Einflüssen werden Proteasen in Form von **Initiator- bzw. nachgeschalteten Effektorcaspasen** zur Einleitung des programmierten Zelltodes aktiv. Durch Funktionsverlust von *Fas* oder durch Inhibierung der Caspasen wird die Apoptose in Krebszellen verhindert [114, 172]. Weiters tragen Onkogene wie das zellwachstumsstimulierende **Myc** zur Tumorentstehung bei [173].

Andere Strategien zur Umgehung des Zelltods sind die erhöhte Expression von **BCL-2**, das Apoptose verhindert, indem es an zwei proapoptotisch agierende Proteine (**Bax** und **Bak**) bindet und diese inaktiviert. Die Expression der Regulatorproteine Bax und Bak kann in Krebszellen überdies vermindert sein [172]. Eine Rolle spielen in diesem Zusammenhang auch der Funktionsverlust von *TP53*, das BCL-2 negativ reguliert, sowie die Inhibierung der Apoptose durch **IGF-1** (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor) [173, 174].

Autophagozytose ist ein ambivalenter Mechanismus, der bei Stressfaktoren wie z.B. Nährstoffmangel zum Zellsterben führt, aber durch den Abbau von zellulären Organellen auch Metaboliten generieren kann, die das Überleben von nährstoffbegrenzten Tumorzellen sichern [175, 176]. Zelltod durch **Nekrose** ist eine weitere Möglichkeit des Körpers, sich geschädigter Zellen durch Aufplatzen zu entledigen. Dabei entlassen diese jedoch ihren Inhalt mit unter Umständen proinflammatorischen Signalen ins Mikromilieu des lokalen Gewebes und können dadurch Entzündungszellen des Immunsystems, z.B. myeloiden Zellen, rekrutieren. Diese **Entzündungsprozesse** durch vom Immunsystem hervorgebrachte Zellen wiederum versorgen das Tumormikromilieu mit Wachstumsfaktoren und weiteren bioaktiven Molekülen und fördern auf diese Weise Zellproliferation, Angiogenese, Invasionen und Metastasierung (siehe auch 1.5.1.5) [177-179].

Veränderungen beim NSCLC:

Die Zellproliferation wird in Krebszellen besonders durch Überexpression von **Myc** (in NSCLC: 5-10 %) und **IGF-1** (in NSCLC: 27-60 %) angeregt [66, 180, 181]. Der Apoptoseregulator **BCL-2** wird in 10-35 % der NSCLCs überexprimiert [132].

1.5.1.4 Replikative Immortalität



Zellwachstums- und Teilungszyklen sind in normalen Zellen limitiert und enden mit der Seneszenz als Übergang zur endgültigen Apoptose. Diese Limitierung kann von Krebszellen aufgehoben werden. Die Telomere der Chromosomen, die unter normalen Umständen sukzessivem Abbau ausgesetzt sind, werden durch die Aktivität von **Telomerasen**, spezialisierten DNA-Polymerasen, verlängert und bleiben somit erhalten. Während Telomerasen an der DNA-Reparatur beteiligt sein können, beschleunigt deren Aktivität auch die Zellproliferation und begünstigt ein resistentes Verhalten der Zellen gegenüber Seneszenz und Apoptose. Telomerasen sind kaum in normalen Zellen zu finden,

während sie in großem Ausmaß (ca. 90 %) in spontan immortalisierten Zellen exprimiert werden. Als transkriptionelle Modulatoren nehmen sie auch Anteil am Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg, der zur Aktivierung spezifischer tumorbegünstigender Gene führt [114, 182-184].

Unterstützung bei tumorinduzierenden Vorgängen bietet auch die Fähigkeit der Krebszellen, Angriffe seitens des körpereigenen **Immunsystems abzuschwächen** bzw. gänzlich abzuwehren [114].

Veränderungen beim NSCLC:

Eine Hauptkomponente der Telomerase ist die katalytische Untereinheit **hTERT**, die mit BRG1, einer Komponente des SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplexes, interagieren und so Wnt-abhängige Reporter zum Fortschreiten der Tumorprogression aktivieren kann (siehe auch 2.2.3). Polymorphismen von *hTERT* beeinflussen die Telomerlänge und könnten eventuell als prognostischer Faktor für den Behandlungserfolg bei NSCLC-PatientInnen herangezogen werden [114, 185].

1.5.1.5 Angiogenese



Die für das Wachstum und metastatische Dissemination von Tumorzellen essentielle Blutversorgung wird einerseits durch die Neubildung von Gefäßen aus Endothelstammzellen (**Vaskulogenese**) und andererseits durch Sproßung neuer Gefäße aus bereits existierenden heraus (**Angiogenese**) gesichert. Die für die Wundheilung und den weiblichen Reproduktionszyklus wichtige, jedoch beim gesunden Erwachsenen nur vorübergehende Anregung der Angiogenese bleibt bei tumorinduzierter Aktivierung bestehen [186]. Wichtige Komponenten der Tumorneovaskulatur sind **Pericyten**, die an der Außenwand von normalen Endothelzellen mechanische und physiologische Funktionen übernehmen. Fehlen diese Hilfszellen, entwickelt sich leichter eine Tumervaskulatur, welche wiederum bei Vorhandensein von Pericyten in ihrer Malignität unterstützt wird [187, 188].

Zellen des angeborenen Immunsystems, die ihren Ursprung im Knochenmark haben und sich an den Rändern (prä)maligner Läsionen anlagern, spielen eine wichtige Rolle bei der Formation und Erhaltung von Blutgefäßen in Tumoren. Zu diesen Zellen gehören besonders myeloide Zellen wie **Makrophagen, neutrophile Granulozyten** oder **Mastzellen** [189-191].

Vaskuläre endotheliale Zellen weisen sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Zelloberflächen-Rezeptoren aus und bieten somit Angriffsfläche für Regulatoren wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A (**VEGF-A**), der die vaskuläre Homöostase regelt, sowie Thrombospondin-1 (**TSP-1**), das in gesunden Geweben übermäßiges Wachstum und Adhäsion endothelialer Zellen inhibiert. Vorhandensein und Funktion derartiger Faktoren beeinflussen in entscheidender Weise die endotheliale Zellproliferation und -Migration. Bei Überexpression von **FGF** ist für die Erhaltung der Angiogenese in Tumorzellen gesorgt [192-194].

Die **Reprogrammierung des Energiemetabolismus** ist ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung von Zellwachstum und Proliferation. Tumorzellen bedienen sich in erhöhtem Ausmaß der **aeroben Glykolyse** und alternativer Stoffwechselwege, um über die Ableitung von

glykolytischen Zwischenprodukten biosynthetische Signalwege zu beschreiten, die u.a. Nukleoside und Aminosäuren für die Synthese von Makromolekülen und Organellen generieren, welche schlussendlich zum Aufbau neuer Zellformationen beitragen. Im Vergleich zu Normalgewebe ist die Laktatkonzentration in Tumoren oft erhöht, während die Glukosekonzentration in Tumorgewebe signifikant niedriger ist [141, 195, 196]. Entscheidenden Einfluss auf die gesteigerte Expression von angiogenetischen Faktoren können Onkogene wie **Ras** und **Myc** haben, die gemeinsam mit inaktiviertem **TP53** zur aeroben Glykolyse in Tumorzellen beitragen [197, 198].

Veränderungen beim NSCLC: **VEGF**, das durch Hypoxie oder onkogene Signale hochreguliert werden kann, trägt Anteil an der Regulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und des TSGs **TP53** sowie an der Aktivierung des Signalmoleküls PI3K und zeichnet, oft in Kombination mit einer Überexpression der VEGF-Liganden aktivierenden Matrix-Metalloprotease 2 (**MMP-2**) und weiteren tumorigenen Faktoren, verantwortlich für eine metastatische Dissemination von Tumorzellen [186, 199-202]. Eine geringe Expression von **TSP-1** sowie Überexpression der Glukose-Transporter **Glut-1** und **Glut-3** im Tumorgewebe geht mit schlechten Überlebensraten bei NSCLC-PatientInnen einher [203, 204].

1.5.1.6 Aktivierung von Invasionen und metastatischer Dissemination



Karzinome nehmen ihren Ausgang vom Epithelialgewebe und schreiten weiter über lokale Invasionen hin zu entfernter Metastasierung. Dabei durchlaufen Krebszellen Formveränderungen, verändern oder verlieren dabei auch ihre zellspezifischen Eigenschaften und lagern sich anders an benachbarte Zellen sowie die extrazelluläre Matrix an. Es erfolgt eine **epithelial-mesenchymale Transition (EMT)**. Epithelzellen werden zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften, d.h., sie erlangen die Fähigkeit, zu invadieren, disseminieren und Apoptoseprozesse abzuwehren [205-207]. Beschleunigt werden Zellmigration und Invasion u.a. durch über das Signalmolekül mTor gesteuerte **Makrophagen** [189, 190].

Die Metastasierung erfolgt in zwei Phasen:

Phase 1: Die veränderten Zellen treten zunächst in naheliegende Blut- und lymphatische Gefäße ein, von wo aus sie ins Parenchym von entfernten Geweben einwandern (**Extravasation**). Krebszellen des Primärtumors disseminieren in entfernte Regionen des Körpers.

Phase 2: Diese Zellen passen sich an das fremde Gewebemilieu an, „**kolonisieren**“ und formieren auf diese Weise Mikrometastasen, die ihren Ausgang in makroskopischen Tumoren nehmen [208-210].

Gene, die für Zell-Zell- und Zell-ECM-Adhäsionsmoleküle kodieren, unterliegen in Karzinomen einer differentiellen Expression. Eine reduzierte Aktivität von **E-Cadherin** beispielsweise begünstigt die Invasions- und Metastasierungsvorgänge. **N-Cadherin** dagegen, das während der Embryogenese oder bei Entzündungen über Zell-Zell-Kontakte die Migration und Invasion von Zellen unterdrückt, ist in invasiven Karzinomzellen oftmals hochreguliert [211-213].

1.5.2 MicroRNAs

Einen besonderen Beitrag zur posttranskriptionellen Deregulation der Genexpression in Lungentumoren leisten die 18-25 nt langen, nicht-kodierenden **microRNAs** („miRNAs“). Die einzelsträngig vorliegenden miRNAs sind wichtige Modulatoren im Zuge der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose [214, 215]. Sie können an die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) der Ziel-mRNAs binden und dadurch eine translationelle Repression oder Degradation der mRNA erwirken, indem sie beispielsweise DNMTs rekrutieren [216, 217]. Anhand zahlreicher Untersuchungen konnte eine Herabregulierung der Expression bestimmter miRNAs bei LungenkrebspatientInnen festgestellt werden, teils findet aber auch Überexpression statt. miRNAs üben auf diese Weise einen Einfluss auf Aktivierung wie auch Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen aus [218, 219].

Eine **reduzierte Expression** von miRNA-prozessierenden Faktoren oder epigenetische Mechanismen in Form von DNA-Methylierungen, die an der miRNA selbst angreifen, stehen oft in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose bei Lungenkrebs Erkrankungen (siehe auch 2.5) [220-222]. Eine in NSCLC herabregulierte Expression im Vergleich zum Normalgewebe ist u.a. bei der let-7-miRNA-Familie (Negativregulation der *RAS*-Onkogene) und der miR-34-Familie, speziell bei *miR-34a* (Teil des *p53*-Reparaturnetzwerks) gegeben. Doch auch bei *miRNA-451* (Zellzyklusprogression, zelluläre Migration) und der EGFR-regulierenden *miRNA-128b* wurde eine verminderte Expression in Tumorgewebe festgestellt [223-230]. Beispiele für **überexprimierte miRNAs** in NSCLC sind *miR-21* (stimuliert Zellwachstum und Invasion), *miR-221* und *miR-222* (Anregung der zellulären Migration) [231-233].

Speziell in Hinblick auf die Überlebensraten oder das klinische Ansprechen auf medikamentöse Therapien wird den miRNAs mittlerweile eine Bedeutung beigemessen, was die potentiellen Einsatzmöglichkeiten betrifft (siehe auch 2.5).

1.5.3 DNA-Reparatur

In einer normalen somatischen Zelle ereignen sich täglich bis zu 10.000 Mutationen [234]. Unsere Körperzellen sind daher von Grund auf mit einem natürlichen DNA-Reparaturmechanismus ausgestattet, der für die Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Zellfunktionen essentiell ist [46]. Sind Zellen irreparabel beschädigt, wird Seneszenz bzw. Apoptose eingeleitet.

Wesentliche Faktoren bei diesen Prozessen sind **p53** und **pRB** (siehe auch 1.5.1.2). Dabei handelt es sich um bereits erwähnte Tumorsuppressorproteine, die im Falle von Schädigungssignalen gemeinsam dafür sorgen, dass die Zellzyklusprogression blockiert und spezifische Gene im Reparaturprogramm aktiviert werden, um eine DNA-Reparatur oder den programmierten Zelltod zu induzieren [235-240]. Inaktivierung von *TP53* ist eine der häufigsten genetischen Veränderungen in Tumoren und findet zu 40-60 % bei NSCLCs statt. Hauptgrund sind Punktmutationen an der Base Guanin (siehe auch 1.4.1) [46, 66, 241]. Etwas seltener, dennoch häufig kommt es zur Inaktivierung des pRB kodierenden Gens *RB* durch Mutationen, z.B. Deletionen, wovon ca. 15-30 % der NSCLC-PatientInnen betroffen sind [66, 132]. Funktionsverluste von in die Reparaturmechanismen involvierter

Gene beschränken die Zelle in ihren Möglichkeiten, DNA-Schäden zu detektieren, diese zu reparieren oder schädliche Moleküle zu inaktivieren [237-240].

Folgende Mechanismen im DNA-Reparatursystem werden unterschieden:

1.) Direkte Reparatur: O^6 -Methyl-Deoxyguanosin wird durch O^6 -Methylguanin-DNA-Methyltransferasen (**MGMTs**; auch O^6 -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferasen [**AGTs**]) repariert, indem diese Methyladdukte von der O^6 -Position des Guanin entfernen und auf sich selbst übertragen. Das ist eine effektive Vorgehensweise, jedoch wird für jede Reparatur ein Protein verbraucht [242-244].

2.) Basenexzision (BER: „base excision repair“): Einzelne geschädigte Basen werden durch DNA-Glykosylasen entfernt sowie Desoxyribosephosphatreste durch AP-Endonukleasen und Phosphodiesterasen beseitigt. Lücken werden durch neue Nukleotide ersetzt [244-246]. Ein wichtiges Reparaturprotein im Hinblick auf Basenexzisionen ist XRCC1 [15].

3.) Nukleotidexzision (NER: „nucleotide excision repair“): Oligonukleotide mit einem weitreichenden Spektrum an Läsionen (z.B. PAK-DNA-Addukte) werden entfernt und der ursprüngliche Zustand der DNA wieder hergestellt. Involviert sind u.a. die DNA-Reparatur- und -Synthese-Gene *ERCC1*, *ERCC2* und *RRM1*, die mit ihren Polymorphismen einen noch größeren Einfluss auf die Lungenkrebsentstehung haben dürften als eventuell abweichende BER-Vorgänge [247-254].

4.) Fehlpaarungsreparatur: Kommt es während der Replikation zu DNA-Fehlpaarungen, wird der fehlerhafte Strang wieder abgebaut und eine Neusynthese anhand des Matrizenstrangs vorgenommen. Für diese Proteine, die im Zuge der DNA-Replikation Korrekturen an der DNA vornehmen können und unabhängig voneinander verschiedene Funktionen zur Vermeidung einer Karzinogenese tragen, kodieren die DNA-Reparaturgene *hMLH1* und *hMSH2*, die auch in Lungenkarzinomen oftmals Defekte aufweisen. Besonders anfällig für Fehler der DNA-Polymerase sind die Mikrosatelliten (siehe auch 1.5) [138].

Neben weiteren zellulären Reparaturmechanismen, die hier nicht näher erläutert werden, sorgen Enzyme der **TET-Familie** durch **Oxidation** von methyliertem Cytosin für die Formation von 5-Hydroxymethylcytosin und ermöglichen somit eine Demethylierung der DNA. Eine besondere Rolle kommt hier TET1 zu, das in Abhängigkeit von α -Ketoglutar säure und FE^{2+} über das Ausmaß der Umwandlung und somit der DNA-Methylierung bestimmt [255-259].

Greifen all diese zellulären Mechanismen nicht, mit Hilfe derer die ursprüngliche Formation der DNA wiederhergestellt oder die Zelle bei Weiterbestehen einer Mutation zur Apoptose geleitet werden soll, führt dies zur Transformation von humanem (Lungen)Gewebe. Multiple Mutationen an kritischen Genen wie auch persistierende Veränderungen am Epigenom führen über aberrante Zellen mit eingeschränkter/gestoppter Wachstumskontrolle und/oder verändertem Expressionsmuster zur Entstehung von Lungenkrebs [36, 46, 260].

Für unser Forschungsvorhaben relevant ist die Tatsache, dass molekulare Veränderungen, die tumorwirksame Gene betreffen, in einer Vielzahl der Fälle auf aberrante Hypermethylierung in der Promoterregion eines Gens zurückzuführen sind.

2. Hintergrund

Neben genetischen Ereignissen in Form von Mutationen oder chromosomalen Translokationen sind **epigenetische Mechanismen** an der Krebsentstehung beteiligt. Während die Basensequenz eines Genoms etwa durch Deletionen, Insertionen, Transversionen/Transitionen oder Allelverlust verändert wird, beschreibt die Epigenetik – ebenso vererbbar, jedoch potentiell reversibel – mitotische und/oder meiotische **Modifikationen der Genexpression**, die **nicht durch Sequenzänderungen hervorgerufen** werden [137, 261, 262]. Epigenetische Mechanismen spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Embryogenese, beim genomischen Imprinting (genetischer Prägung) und bei der weiblichen X-Chromosomen-Inaktivierung. In besonderem Maße nehmen sie auch Anteil an der Regulierung von DNA-Protein-Interaktionen, an der Zelldifferenzierung sowie der DNA- und non-coding-(nc)RNA-Expression durch (post)transkriptionelles Gen-Silencing und können in weitaus größerem Ausmaß vorkommen als Mutationen in somatischen Zellen [137, 262]. Epigenetische Modifikationen werden im wesentlichen durch das Zusammenspiel von **DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und Nukleosomenpositionierung** („Chromatin Remodeling“) gestaltet, welche in neoplastischen Geweben deutliche Veränderungen aufweisen [139, 262].

2.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung spielt eine komplexe Rolle bei der epigenetischen Transkriptionsregulierung von Genen und steht für eine wichtige Komponente bei der Säugetier-Entwicklung und -Zelldifferenzierung [263]. DNA-Methylierung beeinflusst in Kombination mit Histonmodifikationen die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA und dirigiert auf diese Weise Strukturänderungen des Chromatins. Diese Veränderungen haben bei Lockerung der Chromatinstruktur eine Genaktivierung oder, im Falle einer Chromatin-Kompaktierung, die Repression der Transkription (**Gen-Silencing**) zur Folge [137, 262, 264].

Aberrante DNA-Methylierung ist in vielen Fällen ein wesentliches epigenetisches Ereignis bei der Krebsentstehung, welche neben den oder als unmittelbare Folge von in 1.4 genannten Faktoren die Penetranz einer Karzinogenese stark beeinflusst [265, 266]. Durch die Methylierung ist die DNA in der Lage, MBD-Proteine (siehe 2.2.1) zu binden, die über Interaktion mit assoziierten Komplexen Histondeacetylasen und andere transkriptionelle Co-Repressoren rekrutieren. Diese bewirken chemische Modifikationen der Histone (siehe 2.2.2), indem sie beispielsweise negativ geladene Acetylgruppen von den Histonen entfernen. Rekrutiert werden ebenso chromatin-modellierende Enzyme, die die Nukleosomen neu positionieren und durch Kondensierung des Chromatins eine Repression der Transkription erwirken (siehe 2.2.3) [139, 262, 267, 268].

2.1.1 DNA-Methyltransferasen

Die DNA-Methylierung erfolgt durch kovalente Bindung einer Methylgruppe ($-CH_3$) an die 5'-Position von Cytosinbasen, die innerhalb von CG-Dinukleotiden lokalisiert sind. Dies geschieht durch cytosinspezifische **DNA-Methyltransferasen (DNMTs)**, die in neoplastischen Zellen eine erhöhte

Aktivität im Vergleich zu Normalgewebe aufweisen [269]. Es handelt sich dabei um Enzyme, die als Komplex-Proteine den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin (SAM) katalysieren (siehe Abb. 6).

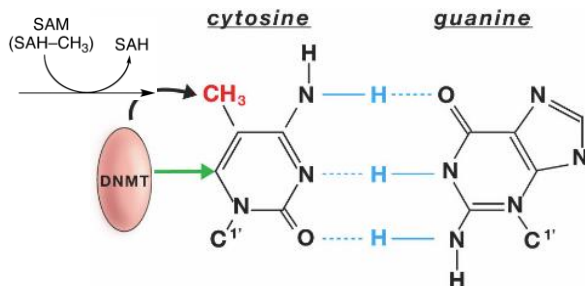


Abbildung 6 Cytosinmethylierung durch DNA-Methyltransferasen. DNMTs (rosa) binden an das Kohlenstoffatom an Position 6 des Cytosins (grüner Pfeil) und benötigen hierfür eine aktive Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin (SAM). Es kommt zu einer Übertragung der Methylgruppe an der 5'-Position des Cytosins (rot).

[270] modif.

Bei den Säugetieren, so auch beim Mensch, spielen drei Methyltransferasen, die an der DNA-Methylierung in bereits differenzierten Zellen beteiligt sind, eine wichtige Rolle: DNMT1, DNMT3A und DNMT3B [271-274]. **DNMT1** ist die in somatischen Zellen am häufigsten vorkommende Methyltransferase [275]. Sie ist für die Beibehaltung eines Methylierungsmusters nach der DNA-Replikation verantwortlich und dient somit der Erhaltungs-Methylierung, die einen wesentlichen Beitrag zur aberranten Cytosinmethylierung in humanen Krebszellen leistet.

DNMT1 wird durch Interaktion mit dem Protein UHRF1, das hemimethylierte DNA erkennt, während der S-Phase des Zellzyklus an die Replikationsgabel geleitet und bindet dort. Zusätzlich interagiert DNMT1 in Zellen mit neu replizierter DNA mit dem Helferprotein PCNA, dessen Aufgabe in der Beschleunigung der DNA-Replikation und -Reparatur liegt. Auf diese Weise werden die Methylierungseffizienz erhöht, direkt Histondeacetylasen und Co-Repressoren wie MeCP2 (siehe auch 2.2.1) gebunden und Transkription verhindert. Eine wichtige Funktion übernimmt auch die für die enzymatische Aktivität von DNMT1 notwendige CXXC-Region (C = Cytosin, X = beliebige Aminosäure), die spezifisch an unmethylierte CpG-Dinukleotide bindet [272, 276-285].

Auch repetitive Elemente wie SINEs und LINEs („short“ bzw. „long interspersed nuclear elements“) können als Ausgangspunkt für eine de-Novo-Methylierung dienen, die sich von dort aus weiter ausbreitet [286, 287]. Bei Experimenten in vitro konnte weiters gezeigt werden, dass unmethylierte DNA einen geringeren Effekt auf die de novo Aktivität von DNMT1 hat als bereits teilweise methylierte DNA, welche das katalytische Zentrum der DNMT1 durch Interaktion mit dem N-terminalen Part des Enzyms allosterisch aktiviert [288-290].

Bei **DNMT3A** und **DNMT3B** handelt es sich um de novo DNA-Methyltransferasen, die im Zuge der DNA-Replikation zuvor unmethylierte DNA methylieren [273, 291]. Die katalytischen Domänen dieser Enzyme sind hochkonserviert [292]. Sie tragen allem Anschein nach auch zur Aufrechterhaltung aberranter Methylierungsmuster im Falle der Absenz von DNMT1 in Säugetierzellen bei und werden wie DNMT1 in Tumorzellen – im Gegensatz zu Normalgewebe – überexprimiert [275, 293]. Festgestellt wurde außerdem ein Zusammenhang zwischen in Lungenkarzinomen minder exprimierten miRNAs 29a, 29b und 29c und der Anwesenheit von DNMT3A und DNMT3B in NSCLCs (siehe 2.5) [221]. Zu den de novo DNMTs gehört indirekt auch **DNMT3L**, die keine aktive

Methyltransferase-Aktivität besitzt, jedoch DNMT3A und DNMT3B durch Komplexbildung reguliert [294-296]. Eine Interaktion der verschiedenen DNA-Methyltransferasen resultiert häufig in Gen-Silencing in Tumorzellen [297]. Die erhöhte Methylierungsdichte von CpG-Inseln (siehe 2.1.2) im Laufe des Alterungsprozesses bzw. der Krebsentstehung könnte mit der erleichterten de-Novo-Methylierung im Umfeld bereits methylierter Sequenzen erklärt werden [298].

2.1.2 CpG-Inseln

Eine **DNA-Hypermethylierung** im Genom findet konzentriert an Cytosinen von CpG-Dinukleotiden statt [262, 267, 291]. CpG-reiche Regionen sind zum einen in parasitischen DNA-Abschnitten oder Retrotransposons gelegen [299, 300]. Die für unsere Untersuchungen relevante Hypermethylierung bestimmter Gene hingegen befindet sich innerhalb der **CpG-Inseln** (nachfolgend als **CGIs** bezeichnet) am 5'-Ende eines Gens. Die CGIs liegen vorwiegend in Promoterbereichen von Genen, können aber auch in Exonbereiche hineinreichen. CGI-Hypermethylierung, nachfolgend als Methylierung bezeichnet, ist somit an der Regulation der Transkription eines Gens beteiligt [262, 267, 291].

CGIs sind 0,5-4 kb kurze Regionen im eukaryotischen Genom, die im Gegensatz zur genomweiten Unterrepräsentation eine erhöhte Dichte an **Cytosin-phosphatidyl-Guanin**-Dinukleotiden aufweisen (siehe Abb. 7) [291, 301, 302]. Es werden ca. 29.000 CGIs im humanen Genom mit einer chromosomalen Verteilung von 5-15 CGIs pro Megabase vermutet [303, 304]. Etwa 60-70 % der humanen Gene haben im Promoterbereich normaler Zellen unmethylierte CGIs. Zwar werden ca. 6 % dieser unmethylierten CpGs gewebespezifisch im Lauf der Embryogenese oder in differenziertem Gewebe zum Zwecke des Imprinting bzw. der X-chromosomalen Inaktivierung methyliert, abgesehen davon ist eine Methylierung der CGIs allerdings eine für Tumorentstehung typische epigenetische Modifikation [305-310]. Denn konträr zur Hypomethylierung, die oftmals eine Aktivierung der Transkription einleitet, sowie zur bereits vorhandenen und Genexpression fördernden DNA-Methylierung im Genkörper führt eine verstärkte Methylierung von CGIs in Promoterregionen zur Repression der Transkription vieler in die zellulären Regulationsmechanismen involvierter (Tumorsuppressor)Gene. Dies wird durch eine Konstitutionsänderung der großen Furche der DNA und dadurch veränderter Basenzugänglichkeit für DNA-bindende Proteine erreicht [64, 137, 262, 264].

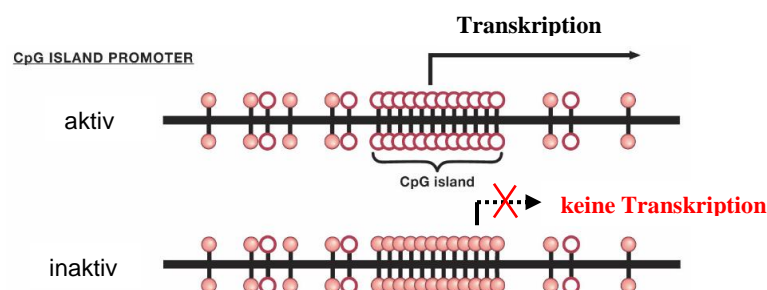


Abbildung 7 CpG-Inseln als Zielgruppe der Promoter-Hypermethylierung. CpG-Dinukleotide, die in einer hohen Dichte in der Promoterregion eines Gens vorkommen, bilden CpG-Inseln und sind für gewöhnlich unmethyliert (leere Kreise). Durch aberrante Cytosin-Methylierung (volle Kreise) innerhalb der Insel-Regionen, wie sie in Tumorzellen oft zu finden ist, werden zuvor aktive Gene nicht mehr transkribiert und es kommt zur Stilllegung des Gens.

[270] modif.

Wenn auch in jüngster Vergangenheit CGIs entdeckt wurden, die trotz räumlicher Entfernung von den Transkriptionsstartpunkten (TSPs) eine Promoter-Regulierungsfunktion aufweisen und eine Rolle bei der Initiation der Transkription spielen können, befinden sich CGIs in der Regel doch in der Nähe von Transkriptionsstartstellen. In Tumoren existieren im Durchschnitt ca. 600 CGIs, die aberrant methyliert sind [311-313].

2.2 Mechanismen der Gen-Inaktivierung durch DNA-Methylierung

Die Inhibition der Genexpression durch CGI-Methylierung funktioniert auf Basis zweier Mechanismen: Die Repression der Transkription erfolgt direkt, indem DNA-bindende Proteine, die als positive Transkriptionsfaktoren agieren, nicht an den Zielort binden können bzw. durch Entfernung der Transkriptionsmaschinerie mitsamt der RNA-Polymerase von der methylierten Promoter-DNA. Eine weitere Möglichkeit besteht allerdings in der Assoziation von Proteinkomplexen, d.h., Gen-Silencing erfolgt durch den Kontakt mit methyl-CpG-bindenden Proteinen (siehe 2.2.1 und Abb. 8) [267, 314, 315].

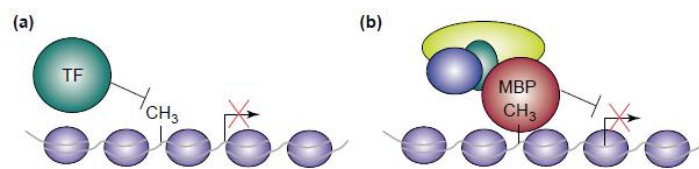


Abbildung 8 Direkte und indirekte Repression eines Gens durch Methylierung von CGIs.

a) Die DNA-Methylierung (CH₃) erfolgt an ähnlichen Bindungsstellen, an denen auch die Transkriptionsfaktoren (TF) andocken. Die Bindungsstelle ist somit nicht mehr frei und die Transkriptionsmaschinerie kann nicht ansetzen. **b)** Die methylierte DNA wird durch methyl-CpG-bindende Proteine (MBPs) erkannt, was zur weiteren Rekrutierung von Co-Repressoren führt. – In beiden Fällen ist eine transkriptionelle Repression des betreffenden Gens die Folge.

[314]

Im Zuge des Gen-Silencing durch DNA-Methylierung finden weitere Modifikationen der Histonproteine (siehe 2.2.2) sowie eine Änderung der Chromatinstruktur mittels Neupositionierung der Nukleosomen (siehe 2.2.3) statt.

2.2.1 Methyl-CpG-bindende Proteine

An die methylierten CGIs können Proteine der methyl-CpG-bindenden Domäne (**MBD**) wie **MBD1**, **MBD2**, **MBD4** und **MeCP2** binden. Diese wiederum sind in der Lage, Co-Repressoren zu rekrutieren, indem sie mit histonmodifizierenden Komplexen wie dem Histondeacetylase-Komplex (HDAC) oder Chromatin Remodeling Komplexen interagieren [316-318]. So wird eine transkriptionelle Repression der betroffenen Gene mit oftmals entscheidender Bedeutung für die Initiation oder das Fortschreiten einer Krebserkrankung erwirkt [319].

MBD1 spielt in der S-Phase des Zellzyklus eine besondere Rolle. Es interagiert mit der H3K9-Methyltransferase SETDB1 und formt einen vorübergehenden Komplex mit CAFp150, der während der DNA-Replikation an methylierte CGIs andockt und eine Chromatinkompaktierung bewirkt [320, 321]. **MBD2** assoziiert mit dem Nukleosomalen Remodeling Komplex (NuRD), der auch

Histondeacetylase-Aktivität besitzt, und wird dadurch ebenfalls an die methylierte DNA gebunden [322, 323]. **MBD4** ist zum einen an der DNA-Reparatur beteiligt, fungiert allerdings wie MBD2 ebenfalls als transkriptioneller Repressor [324-326]. **MeCP2** kann in zwei strukturelle Domänen unterteilt werden: die methyl-CpG-bindende Domäne (MBD) – diese erkennt durch Interaktion mit der Doppelhelix methylierte CpG-Dinukleotide – und die Domäne der transkriptionellen Repression (TRD), die mit anderen regulatorischen Proteinen in Kontakt tritt. MeCP2 kann unter gewissen Umständen Histon 1 ersetzen oder interagiert über die TRD mit dem Transkriptionsfaktor IIB (TFIIB), einem an der Initiation der Transkription beteiligten Protein und bewirkt damit eine transkriptionelle Repression [327-329].

Ein anderes methyl-CpG-bindendes Protein ohne methyl-CpG-bindende Domäne ist **Kaiso**. Es assoziiert mit dem Histondeacetylase beinhaltenden Co-Repressorkomplex N-CoR und erkennt methylierte DNA mittels C-terminaler Zinkfinger-Domäne, weshalb es sich bei diesem Protein um eine weitere Komponente im Bereich der methylierungsabhängigen Repression der Transkription handelt [330, 331].

2.2.2 Histonmodifikationen

Ein weiterer Mechanismus zur Regulation der Genexpression ist die posttranslationelle, kovalente Modifikation der Histonproteine. Histone sind nicht nur für die Verpackung der DNA zuständig, sondern entscheiden ausgehend vom Modifikationsstatus ihrer vorwiegend N-terminalen Enden über die Zugänglichkeit der DNA für die DNMTs und somit über nachfolgende Methylierungen bzw. transkriptionelle Aktivität einer Region [291, 332]. Zu diesen Modifikationen zählen u.a. Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung und Sumoylierung der Histone [333, 334].

Die **Acetylierung** von Histonproteinen durch Histonacetyltransferasen (HATs) wird generell mit der Aktivierung eines Gens assoziiert, Deacetylierung hingegen kennzeichnet transkriptionell inaktives Chromatin. Bei der **Histonmethylierung** durch Methyltransferasen (HKMTs) bestimmen die betroffene Aminosäure und deren Position über den Einfluss auf die Genexpression [335, 336]. Speziell das Methylierungsmuster von Histon 3 ist in Mammalia mit der Aktivität von DNA-Methyltransferasen assoziiert. Die Trimethylierung von Lysin 4, 36 oder 79 z.B. ist charakteristisch für transkriptionell aktives Chromatin, die Di- oder Trimethylierung von Lysin 9 hingegen charakterisiert transkriptionell inaktives Chromatin [332, 337-342].

Da die Position der Nukleosomen während der DNA-Replikation und im Zuge unterschiedlicher Genexpressionsstadien entscheidend verändert werden kann, sind Muster wie diese ausschlaggebend für die Struktur des Chromatins [343]. Beispielsweise sind der Verlust der Monoacetylierung von Lysin 16, an dem das in Lungenkarzinomen überexprimierte Sirtuin Sirt1 seinen Anteil trägt, sowie der Verlust der Trimethylierung von Lysin 20 am Histon 4 entscheidend hinsichtlich maligner Veränderungen in humanen Krebszellen [344].

2.2.3 Nukleosomenpositionierung

Durch Rekrutierung von „Chromatin-Remodeling“-Komplexen kann mittels ATP-Hydrolyse eine Änderung der Nukleosomenkomposition und somit eine Strukturänderung des Chromatins herbeigeführt werden [270]. So steuert der aus zumindest neun Untereinheiten bestehende **SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplex** die energieabhängige, für die Differenzierung und Proliferation von Zellen kritische, Umgestaltung der Chromatinstruktur (siehe Abb. 9) [345]. Er aktiviert oder reprimiert die Transkription von Genen, indem er der Transkriptionsmaschinerie durch Neupositionierung der Nukleosomen den Zugang zur DNA ermöglicht oder verwehrt. Damit spielt er u.a. eine wichtige Rolle für die durch Tumorsuppressorgene gesteuerte Zellzyklus- und -wachstumskontrolle. Eine wichtige Funktion erfüllen die Komplex-Komponenten BAF60A, SNF5, BRG1 oder Brahma (BRM), deren ursprüngliche Aufgabe es ist, einzeln oder gemeinsam mit anderen tumorsupprimierenden Komponenten des Komplexes einer malignen Entartung der Zelle vorzubeugen. Kommt es beispielsweise aufgrund verstärkter Methylierung von Genen zu einer Instabilität in der Zelle, ist MeCP2 in der Lage, mit dem Sin3a/Histondeacetylase-Co-Repressor-Komplex (Sin3a/HDAC) und mit Brahma zu interagieren, was zu einer Deacetylierung der Histone, in weiterer Folge zu einer Verdichtung der Nukleosomen und somit zu einer stabilen repressiven Chromatinstruktur führt. Der Funktionsverlust des SWI/SNF-Komplexes bewirkt speziell beim Lungenkarzinom oftmals (Epi)Mutationen der betreffenden Gene (z.B. *TP53*, *p16*), die somit nicht selten in eine maligne Transformation des Lungengewebes münden [346-351].

Ebenso Einfluss auf die Chromatinstruktur nehmen die **Trithorax-** (TrxG) sowie die antagonistisch wirkenden **Polycomb-Proteine** (PcG) als Schlüsselregulatoren der Zellproliferation [270]. TrxG begünstigt im ursprünglichen Zustand einer Zelle die aktive Expression von Genen, z.B. durch Trimethylierung von Lysin 4 am Histon 3 und Acetylierung von Histon 4. Polymorphismen von MLL, einer Histonmethyltransferase der Trithorax-Gruppe, werden mit Tumorprogression assoziiert.

Im Gegensatz dazu ist die Aufgabe der PcGs, die epigenetische Repression bestimmter Gene zu fördern, besonders jene der *HOX*-Gene. Dies passiert mittels zweier Komplexe namens PRC1 und PRC2, und zwar durch Methylierung von Lysin 9 und/oder 27 am Histon 3 und Inhibierung der Acetylierung von Histon 4. Überexpression von EZH2, einer PRC2-Komponente, wird mit Lungenkrebsentstehung in Zusammenhang gebracht [270, 352-354].

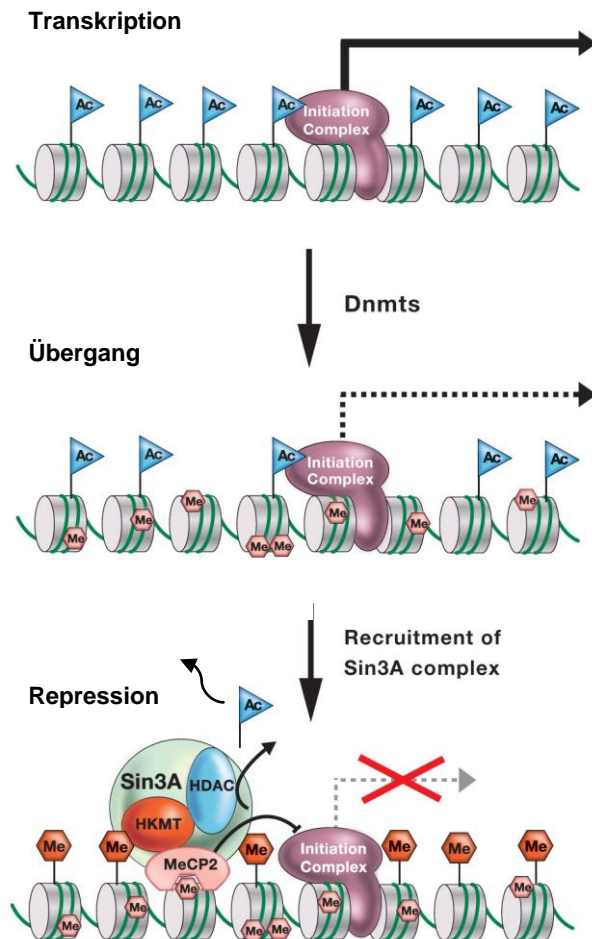


Abbildung 9 Zusammenfassende Darstellung des Übergangs vom aktiven zum transkriptionell inaktiven Chromatinstatus.

Transkription Zunächst liegt die DNA in ursprünglichem Zustand mit unmethylierter CGIs und hyperacetylierten Histonen vor. Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase können an den Promoter binden und formieren einen Transkriptions-Initiations-Komplex, der die Expression des Gens ermöglicht.

Übergang: DNA-Methyltransferasen sorgen für eine Methylierung (Me) der Cytosine.

Repression: Methyl-CpG-bindende Proteine wie MBD1, MBD2, MBD4 (nicht im Bild) und MeCP2 assoziieren mit Co-Repressoren, z.B. Histondeacetylasen, sowie weiteren histonmodifizierenden und Chromatin Remodeling Komplexen. Dadurch verändert sich die Chromatinstruktur: Die Nukleosomen werden enger aneinander gelagert und potenziell transkriptionell aktives Euchromatin wird in stark kondensiertes, inaktives Heterochromatin umgewandelt. Die Transkription wird gestoppt.

Sin3A: Sin3/Histondeacetylase-Komplex (Sin3/HDAC)
HKMT: Histone H3-Methyltransferase

[270] modif., [316-318]

2.3 DNA-Methylierung beim NSCLC

DNA-Methylierung beeinflusst die Regulierung des Zellzyklus und der Seneszenz, Apoptose- und DNA-Reparatur-Vorgänge, Differenzierungsprozesse sowie die Zelladhäsion/-migration [144, 355].

Krebszellen können einen genomweiten Methylierungsrückgang um 20-60 % aufweisen. Die **Hypomethylierung** betrifft in erster Linie repetitive Sequenzen und trägt damit zu Translokationen, Reaktivierung von endoparasitischen Sequenzen und chromosomaler Instabilität im humanen Genom bei [355-357]. Hiervon betroffen ist im Lungenkarzinom vor allem das aktiv transkribierte L1-Retrotransposon der **LINES** [358]. Durch Hypomethylierung an spezifischen Promotoren kann es zur Expression von Onkogenen und an einigen Stellen zum Verlust genetischer Prägung (LOI = Loss of imprinting) kommen. Letzteres wurde beim Insulinähnlichen Wachstumsfaktor 2 (**IGF-2**) und in Zusammenhang mit Veränderungen in der Chromatinkonfiguration als auch Genexpression beobachtet und dürfte mit der Progression von Lungenkrebs in Zusammenhang stehen [359, 360].

Im Gegensatz dazu bedingt CGI-**Hypermethylierung** eine Repression der Transkription und stellt damit in vielen Fällen die zweite inaktivierende Veränderung bei Tumorsuppressorgenen, die allerdings nicht in Promoterregionen eines bereits mutierten Allels eines Gens stattzufinden scheint [262, 361-363].

Die genauen Umstände, unter welchen eine Methylierung von CGIs in Tumorzellen stattfindet, sind noch weitgehend unbekannt. Es ist bis heute nicht ganz klar, ob sie den Startpunkt für die darauffolgende Inaktivierung eines Gens darstellt oder ob es sich möglicherweise um ein der Gen-Inaktivierung folgendes Ereignis zur Aufrechterhaltung einer stabilen, vererbaren Repression handelt [364]. Erkennbar ist, dass Gene, die im differenzierten Lungengewebe exprimiert werden, in Tumoren reprimiert werden, während für gewöhnlich nur in frühen Entwicklungsstadien exprimierte Gene in Lungenkarzinomen erneut aktiviert werden. Der genaue Mechanismus hinter diesen Expressionsmustern bedarf noch weiterer Forschung [365-367].

Hypermethylierung, die nachfolgende Kaskade chemischer Modifikationen der Histonproteine sowie Veränderung der Chromatinstruktur tragen in Bezug auf NSCLC insbesondere zur transkriptionellen Inaktivierung von Genen bei, die vorwiegend im Spätstadium der normalen Lungenentwicklung exprimiert werden und aller Wahrscheinlichkeit nach für die Aufrechterhaltung eines differenzierten Zellstatus ausschlaggebend sind [368].

Betroffen ist beispielsweise das DNA-Reparaturgen *MGMT* [369, 370], was eine Prädisposition des jeweiligen Gewebes hinsichtlich weiterer Mutationen in Schlüsselgenen wie *KRAS* oder *TP53* implizieren dürfte [369, 371]. Eine Auswahl weiterer in NSCLC häufig methylierter, tumorsupprimierender Gene sind in Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1 Methylierungshäufigkeit von Genen in NSCLC.

Genname(n)	Funktion	NSCLC in %	Ref.
<i>MGMT</i>	DNA-Reparatur	16-38	[171]
<i>p16</i> (<i>p16^{INK4a}</i> , <i>CDKN2A</i>)	Regulation des Zellzyklus	25-41	[171]
<i>RAR-β</i> (<i>NR1B2</i>)	Zellwachstum- und differenzierung	41	[132, 372]
<i>APC</i>	Zellteilung, -adhäsion und -migration	46	[66]
<i>RASSF1A</i> (<i>RASSF1</i> , <i>NORE2A</i>)	Regulation des Zellzyklus	40	[132]
<i>FHIT</i>	Regulation des Zellzyklus, Apoptose	37-38	[67] [132, 171]
<i>hMLH1</i> (<i>MLH1</i>)	DNA-Reparatur	36	[138, 171]
<i>GSTP1</i>	Detoxifizierung von Karzinogenen	7	[373]
<i>CDH1</i> (<i>E-Cadherin</i>)	Zelladhäsion	18-25	[171]
<i>CDH13</i> (<i>H-Cadherin</i>)	Zelladhäsion	43-45	[66]
<i>TSLC1</i> (<i>CADM1</i>)	Zelladhäsion	37-44	[171, 374]
<i>DAL1</i> (<i>EPB41L3</i>)	Zelladhäsion	55-57	[171, 375]
<i>RUNX3</i> (<i>AML2</i>)	Apoptoseregulator	25	[171]
<i>DAPK</i> (<i>DAPK1</i>)	Apoptoseregulator	16-44	[171]
<i>TIMP3</i>	Apoptoseregulator	26	[373]
<i>hSRBC</i> (<i>PRKCDP</i>)	DNA-Reparatur(?)	41	[376]

Prozentzahlen enthalten Ergebnisse aus Studien mit prognostischer Relevanz, aber auch aus Studien, die keine prognostische Relevanz finden konnten. Die tatsächliche Methylierungshäufigkeit hängt u.a. von der Tumorart ab.

Aufgezeigt werden konnte weiters, dass die Hypermethylierung gewissen Mustern folgt:

Methylierung ist gewebespezifisch.

Im Zuge einer Methylierung entstehen tumortypspezifische Muster [313, 316, 377, 378]. Normales Lungengewebe kann anhand der Methylierungsraten verschiedener Gene mit einer über 95%igen Sensitivität und Spezifität von Tumorgewebe unterschieden werden. Unterschiede in der Methylierungshäufigkeit der Gene liegen nicht nur zwischen den verschiedenen Lungenkrebsarten vor, sondern können auch innerhalb der NSCLC-Subtypen ausgemacht werden: *APC*, *CDH13*, *RARβ*, *CCND2*, *KCNH5* und *RUNX3* etwa weisen in Adenokarzinomen eine deutlich höhere Methylierungsrate als in Plattenepithelkarzinomen auf, während *p16* häufiger in Plattenepithelkarzinomen methyliert ist (siehe Abb. 10) [373, 379-383].

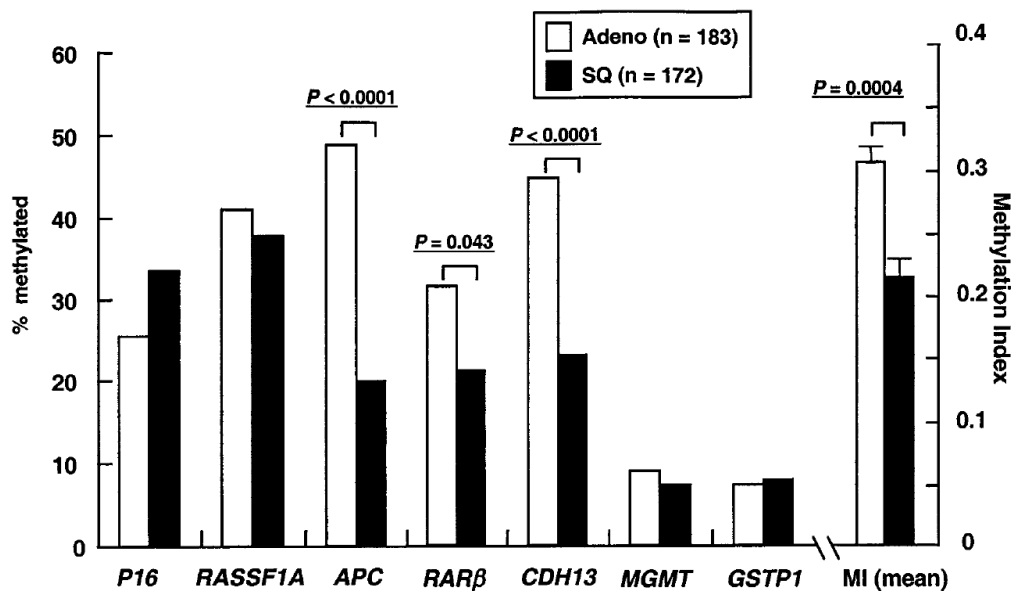


Abbildung 10 Beispiel der Methylierungsunterschiede anhand zweier NSCLC-Subtypen. Die Gene *APC*, *RAR-β* und *CDH13* sind signifikant öfter in Adenokarzinomen methyliert als in Plattenepithelkarzinomen. Die Methylierungshäufigkeit von *p16* ist hingegen in Adenokarzinomen geringer als beim Plattenepithelkarzinom (statistisch nicht signifikant).

Weißer Balken: Adenokarzinom. Schwarzer Balken: Plattenepithelkarzinom

[382]

Weiters wurde gezeigt, dass tumorspezifische Methylierungsunterschiede auf die Rauchgewohnheiten zurückzuführen sind: An NSCLC erkrankte RaucherInnen weisen eine höhere Methylierungsrate von *p16* und *APC* auf als NichtraucherInnen (siehe Abb. 11) [373, 382].

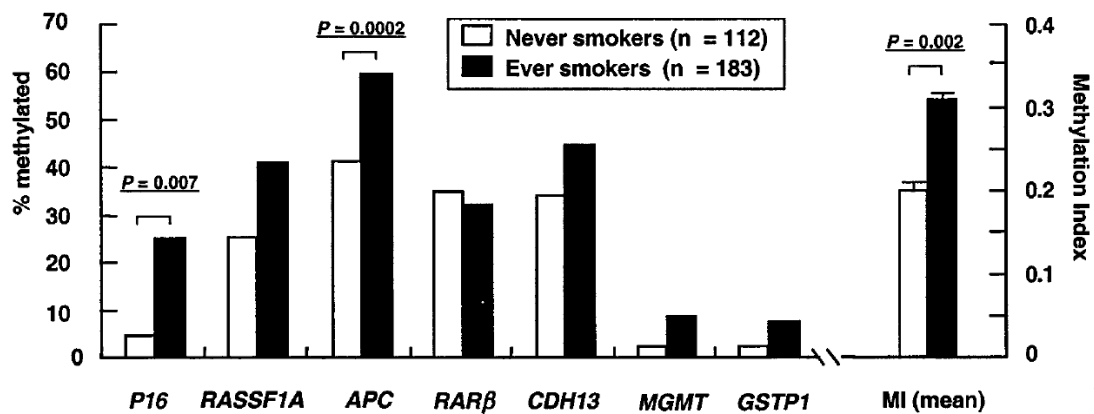


Abbildung 11 Methylierungsunterschiede zwischen RaucherInnen und NichtraucherInnen.

Die Gene *APC* und *p16* sind signifikant öfter in Adenokarzinomen von lebenslangen RaucherInnen als in Adenokarzinomen von NichtraucherInnen methyliert. Ein Unterschied in der Methylierungshäufigkeit, wenn auch ohne statistische Signifikanz, wurden ebenfalls bei den Genen *RASSF1A* und *CDH13* entdeckt.

Weißer Balken: NichtraucherInnen. Schwarzer Balken: RaucherInnen

[382]

Ferner gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede. Die Gene *KCNH5*, *KCNH8* und *RARβ* sind bei Adenokarzinom-Patientinnen signifikant häufiger methyliert als bei männlichen Patienten mit Adenokarzinom [383]. Unterschiedliche Signalwege und/oder Risikofaktoren wie hormonelle Faktoren oder unterschiedliche DNA-Reparatur-Kapazitäten könnten eine Erklärung für dieses Phänomen sein [384-386]. Weiters gibt es Hinweise darauf, dass hinsichtlich der Methylierungsmuster und -häufigkeiten eine geographische Relevanz gegeben ist. *MGMT* und *GSTP1* sind Gene, die in einer untersuchten PatientInnengruppe aus den USA und Australien signifikant stärker methyliert waren als bei erkrankten Personen aus Japan oder Taiwan. Möglicherweise kommen hier kulturelle Unterschiede betreffend des Life Styles, der Umweltbelastungen und der darauffolgenden molekularen Pathogenese zum Tragen [382]. Außerdem wurde ein gewisser Zusammenhang zwischen der DNA-Hypermethylierung und bestimmten mutagenen Veränderungen postuliert: *p16*- und *CDH13*-Hypermethylierung in ADCs korreliert mit weniger *EGFR*-Mutationen im Tumorgewebe. Umgekehrt findet man eine niedrigere Methylierungsrate in Tumorgewebe mit vielen *EGFR*-Mutationen. Die *KRAS*-Mutationsrate hingegen war signifikant erhöht in Tumoren mit hypermethyliertem *p16* im Vergleich zur unmethylierten *p16*-Variante. Dies deutet darauf hin, dass genetische und epigenetische Veränderungen in Beziehung zueinander stehen und unterschiedliche tumorigene Prozesse bewirken [387].

2.4 Potentielle Bedeutung der DNA-Methylierung als Biomarker

DNA-Methylierung bestimmter Gene kann potentiell eine diagnostische als auch prognostische Bedeutung haben und im günstigsten Fall einen Ansatz für eine medikamentöse Therapie darstellen [262, 388-391]. Zu diesem Zweck muss herausgefunden werden, wie die Forschungsergebnisse in die klinische Praxis umgesetzt werden können [66].

Der Methylierungsstatus bestimmter Gene kann in Körperflüssigkeiten wie Blutserum, Sputum, bronchialem Sekret oder in Gewebeproben nachgewiesen werden. WissenschaftlerInnen spekulieren daher über die Möglichkeiten zukünftiger routinemäßiger Nachweise im Rahmen von Untersuchungen (potentieller) PatientInnen und über den tatsächlichen medizinischen Nutzen [197, 265, 389, 392]. Heute kennt man bzw. untersucht noch eine Reihe an (potentiellen) molekularen Biomarkern, die Prognosen über die Rezidiv- oder Überlebensraten von LungenkrebspatientInnen zulassen. Prä malign vorhandene, also für eine frühe Diagnose einer (bevorstehenden) Lungenkrebserkrankung detektierbare Methylierung von *p16* lässt auf schlechte Überlebenschancen bei ADCs schließen und kann, wie auch die Methylierung von *RASSF1A*, *APC* und *CDH13* mit dem Auftreten eines Rezidivs nach einer Resektion in Zusammenhang gebracht werden [393-397]. Überlegungen gehen auch in die Richtung, miRNAs potenziell vielleicht nicht nur als Marker, sondern auch als Therapeutikum einsetzen zu können (siehe 2.5) [398].

Zu den wesentlichen **Kriterien** eines guten Biomarkers gehört die Eigenschaft, PatientInnenproben zur Detektion des jeweiligen Markers nicht bzw. nur minimal invasiv erhalten zu können [399]. Weiters ist wichtig, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe detektiert wird, der auch mit der Tumorentstehung assoziiert ist. Nicht minder relevant ist eine größtmögliche Kosteneffizienz, um weitreichende Einsätze gewährleisten zu können. Diese und andere Punkte müssen bei den Überlegungen zu den potentiellen klinischen Einsatzmöglichkeiten von Biomarkern berücksichtigt werden.

2.5 Reaktivierung von durch DNA-Methylierung inaktivierten Genen

Die Hypermethylierung von Genen kann hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Marker von kanzerogenen Veränderungen eventuell von klinischer Bedeutung sein und schürt die Hoffnung auf zukünftige medikamentöse Behandlungen in Form von Veränderungen des Expressionsprofils und Reaktivierung hypermethylierter (Tumorsuppressor)Gene [268]. Angesetzt werden könnten an dieser Stelle z.B. Histonmethyltransferasen, die gesilencete Gene reaktivieren können [316]. Weiters sind Demethylasen in der Lage, Lysinmethylierung, die je nach Position in der Histonkette ein Signal für transkriptionelle Aktivierung oder Repression darstellt, zu verändern [400].

Speziell im Bereich der DNMT- und Histondeacetylase-Inhibitoren konnten auf experimenteller Ebene bereits erfreuliche Forschungsergebnisse hinsichtlich der künftigen Behandlung von NSCLC erzielt werden [401, 402]. Entdeckt wurde, dass DNMT-Inhibitoren zu Differenzierungsprozessen beitragen und dass die **Inhibierung von DNA-Methyltransferasen**, in signifikantem Ausmaß allerdings nur in Kombination mit einer **Hemmung der Histondeacetylasen**, die Funktionalität von

Genen wieder herbeiführen sowie die weitere Entstehung von (Lungen)Krebs mindern kann [403-406]. Stark hypermethylierte und somit inaktivierte Tumorsuppressorgene können in humanen Krebszellen durch den Einsatz demethylierender Agenzien wie z.B. 5-Aza-2'-Deoxycytidin (**Aza-dC**, **DAC**) gemeinsam mit einem Histondeacetylase-Inhibitor (HDI) wie Trichostatin A (**TSA**) wieder exprimiert werden und bilden in dieser Kombination nur eine von verschiedenen Einsatzvarianten von DNMT-Inhibitoren und HDIs bei zukünftigen Therapieansätzen (siehe Abb. 12) [139, 268, 335, 346, 406-408]. DAC reduziert die enzymatische Aktivität der DNMT, indem es einen stabilen Komplex zwischen dem Enzym und dem Cytosin-Analog in der DNA formt und inhibiert durch folgende Degradation der DNMTs die DNA-Methylierung [409, 410]. Durch das geringere Ausmaß der Methylierung werden weniger MBD-Proteine rekrutiert, TSA findet weniger zu inhibierende Histondeacetylase vor und Aktivierungskomplexe können anstelle der reprimierenden Komplexe binden [268]. Ähnliche Resultate erhält man durch die Kombination von Aza-dC mit dem HDI **Natrium-Phenylbutyrat** [406].

Ein anderer getesteter DNMT-Inhibitor ist **5-Azacytidin**, das wie Aza-dC ein Basenalog für Deoxycytidin darstellt, jedoch eine höhere Toxizität aufweist [411]. Weitere potentiell vielversprechende Histondeacetylase-Inhibitoren sind **OSU-HDAC-44** und die Hydroxamsäure **SAHA** (siehe auch Kapitel 6) [402, 412].

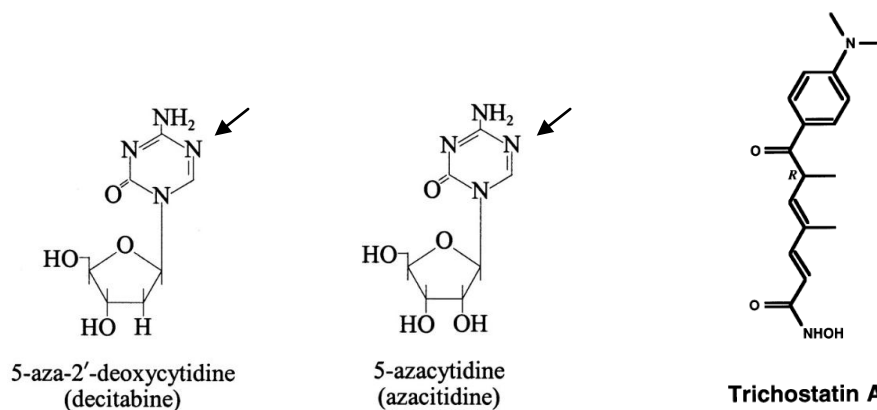


Abbildung 12 DNMT- und Histondeacetylase-Inhibitoren. Bei den beiden Cytidinanalogen 5-Aza-2'-Deoxycytidin und 5-Azacytidin befindet sich anstelle der 5'-Position anstatt des Kohlenstoffs ein Stickstoffatom. Aufgrund dieser Modifikation kann keine Methylgruppe am Pyrimidinring gebunden werden. Trichostatin A dagegen interferiert mit der katalytischen Untereinheit der Histondeacetylase und verhindert so die Entfernung der Acetylgruppen von den Histonen.

[411, 413]

Neben oben genannten Substanzen wurden kürzlich auch **miRNAs** identifiziert, die in Lungenkarzinomen und Normalgewebe unterschiedlich stark exprimiert werden und einen Einfluss auf Methylierungsvorgänge nehmen können (siehe auch 1.5.2). Unter ihnen befinden sich miRNAs der in Lungenkarzinomen häufig herabregulierten miR-29-Familie (29a, 29b und 29c), deren Expression einen reziprok proportionalen Zusammenhang mit der Expression der DNA-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B in NSCLC aufweist. Es wurde beobachtet, dass eine gesteigerte Expression von miR-29s in Lungenkrebs-Zelllinien zur Wiederherstellung eines normalen Methylierungsmuster führt und die Tumorigenität der Zelllinien inhibiert wird [221]. Weiters besteht ein Zusammenhang

zwischen reduzierter let-7-Genexpression und schlechten Überlebensprognosen bei NSCLC-PatientInnen [219, 224]. Die Forschungsergebnisse lassen somit auf eine zukünftige Anwendungsmöglichkeit synthetischer miRNAs in Lungenkarzinomen zur Reaktivierung von durch Methylierung inaktivierten Tumorsuppressorgenen hoffen.

In umgekehrter Weise hat das Expressionsprofil von miRNA let-7a-3 tumorwirksame Bedeutung. Let-7a-3 wurde in normalem Lungengewebe stark methyliert vorgefunden, während sie in einigen Adenokarzinomen durch Hypomethylierung aktiviert vorliegt und durch ihre Expression scheinbar onkogene Wirkung hat [222].

Der Einsatz von Pharmazeutika zum Zwecke der Verhinderung bzw. Reversion epigenetischer Inaktivierung von tumorrelevanten Genen scheint demnach zukunftsweisend [406].

3. Präliminäre Daten und Ziele

In unserer Forschungsarbeit konzentrieren wir uns auf Untersuchungen von DNA-Methylierungen im NSCLC, bei dem es sich obgleich der enormen Fortschritte auf dem Gebiet der Lungenkrebsforschung in den vergangenen Dekaden noch immer um Tumoren mit hoher Rezidivwahrscheinlichkeit nach kurativen Resektionen sowie einer sehr hohen Mortalität handelt [13].

3.1 Präliminäre Daten

Die Arbeitsgruppe von Frau Ao. Univ.-Prof. Dr. Sabine Zöchbauer-Müller arbeitet seit mehreren Jahren erfolgreich an der Identifizierung von Methylierungsveränderungen bei malignen Erkrankungen, insbesondere dem NSCLC [66, 131, 171, 373, 376, 414-417].

In einem kürzlich durchgeführten Forschungsprojekt wurde das **genomweite Methylierungsmuster** von CpG-Inseln in primären Tumorproben und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von 101 NSCLC-PatientInnen im Stadium I-III untersucht. Insgesamt wurde der Methylierungsstatus von über 28.000 CGIs in Lungentumoren und korrespondierenden nicht-malignen Lungengeweben mittels **MeDIP-Chip-Analysen** bestimmt. Es handelt sich dabei um eine Kombination der Immunpräzipitation von methylierten DNA-Fragmenten mit der Microarray-Methode [418, 419]. Die extrahierte DNA wurde zunächst mittels Ultraschall in 200–900 bp lange Fragmente zerkleinert, die methylierten DNA-Fragmente unter Verwendung eines Antikörpers gegen 5-Methylcytosin isoliert, anschließend amplifiziert und markiert. Nachfolgend konnte die Analyse mit speziellen Microarrays (MeDIP-Chip) durchgeführt werden. Die dadurch gewonnenen Daten wurden statistisch ausgewertet.

Durch Vergleich der genomweiten Methylierung in Tumorgeweben mit jener in korrespondierenden nicht-malignen Lungengeweben wurden 2.414 statistisch signifikant unterschiedlich methylierte genomische Regionen identifiziert. Während 97 % dieser Regionen tumorspezifisch methyliert war, wies nur 3 % der Regionen eine stärkere Methylierung in nicht-malignen Lungengeweben im Vergleich zu den primären Tumorgeweben auf.

Die tumorspezifisch methylierten Regionen wurden in weiterer Folge einzelnen Genen zugewiesen. Insgesamt konnten 298 Gene identifiziert werden, welche tumorspezifisch in NSCLCs methyliert sind. Unter diesen Genen sind 254 bekannte, proteinkodierende Gene und 40 derzeit unbekannte Gene. Weitere Analysen zeigen, dass jedes der 254 Gene mit einer CpG-Insel assoziiert ist. Von der Mehrheit dieser Gene war bisher nicht bekannt, dass sie in NSCLCs methyliert sein können. Weiters wurde gezeigt, dass eine Vielzahl der tumorspezifisch methylierten Gene an der Regulierung der Genexpression (121 Gene) und der Zelladhäsion (37 Gene) beteiligt sind. Außerdem wurde beobachtet, dass mehrere tumorspezifisch methylierte Gene in Genclustern organisiert sind (z.B. HOXA-Cluster auf 7p15-p14, HOXB-Cluster auf 17q21.3, HOXD-Cluster auf 2q31, PCDH-Cluster auf 5q31) [420].

Die in dieser Studie gewonnenen Daten bilden die Grundlage für diese Diplomarbeit.

3.2 Ziele dieser Diplomarbeit

3.2.1 Entwicklung genspezifischer Methylierungsanalysen

Intention dieser Diplomarbeit war es, die Methylierung einiger, mit Hilfe der MeDIP-Chip-Analyse identifizierten Gene durch Einzelgen-Methylierungsanalysen zu bestätigen. Hierfür wurden genspezifische Methylierungsassays zum Nachweis der DNA-Methylierung bei ausgewählten Genen entwickelt, dessen Ergebnisse zunächst anhand von NSCLC-Zelllinien überprüft wurden.

Für die Analysen wurden die Gene *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* gewählt, die laut MeDIP-Chip-Analyse eine tumorspezifische Methylierung aufweisen. Es handelt sich dabei um proteinkodierende Gene, die eine Rolle als Transkriptionsfaktoren spielen.

GENNAME	SYNONYME	LOKALISATION
EVX1 (Eve, even-skipped homeo box homolog 1)	-	7p15.2
HOXA9 (Homeobox A9)	<i>HOX1, HOX1G</i>	7p15.2
IRX2 (Iroquois homeobox protein 1)	<i>IRXA2</i>	5p15.33
PCDHA12 (Protocadherin alpha 12)	<i>MGC138485</i>	5q31
SFMBT2 (Scm-related gene containing four mbt domains 2)	<i>KIAA1617</i>	10p14

EVX1 dürfte als transkriptioneller Repressor während der Embryogenese fungieren und ist an der Spezifizierung von neuronalen Zelltypen beteiligt.

HOXA9 ist Mitglied des HOXA-Clusters, dessen Gene zu 85 % tumorspezifisch methyliert sind [420]. HOX-Gene sind an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt und deren Methylierung dürfte entscheidenden Einfluss bei der Tumorigenese haben [421].

IRX2 scheint bei Vertebraten in erster Linie in die embryonale Musterbildung involviert zu sein.

PCDHA12 gehört zum Protocadherin-alpha-Gencluster und befindet sich unter jenen 37 tumorspezifisch methylierten Genen, die mit der Zelladhäsion in Verbindung gebracht werden. Es konnte eine häufigere Methylierung in ADCs im Vergleich zu anderen NSCLCs festgestellt werden, was auf eine tumortyp-spezifische Methylierung hinweist [420]. Auch wurde die Methylierung von nahezu allen Mitgliedern des PCDHA-Clusters in Wilms-Tumoren beschrieben [419].

Über die Funktion von **SFMBT2** ist noch wenig bekannt. Festgestellt wurde, dass sie bei der Regulation der Gentranskription in Mäusen eine Rolle spielen dürfte [422]. Weiters konnte eine Methylierung von **SFMBT2** auch in der Follikuläres-Lymphom-Zelllinie RL gefunden werden [423].

(Daten u.a. aus ENSEMBL Datenbank, Ausgabe 66 sowie Genecards, Version 3.07).

Ziel der folgenden Untersuchungen ist die Bestätigung der mittels MeDIP-Chip-Analyse erhaltenen Resultate in Hinblick auf die tumorspezifische Methylierung der fünf beschriebenen Gene bei NSCLC-PatientInnen. Zu diesem Zweck werden Gewebeproben von Primärtumoren und den korrespondierenden nicht-malignen Lungengeweben von 97 NSCLC-PatientInnen auf Methylierung

der Gene *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* untersucht. Hierfür werden Bisulfitkonvertierungen sowie methylierungssensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalysen (MS-HRM) durchgeführt. Anschließend erfolgt die Klonierung und genomische Bisulfitsequenzierung eines Teils der 5'-Regionen der beschriebenen Gene in primären NSCLC-Proben sowie dem korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebe, um die Methylierung der genomischen Regionen näher zu überprüfen.

Zur Ermittlung eines etwaigen Zusammenhangs zwischen der Methylierung des Gens *SFMBT2* und dessen Proteinexpression werden zudem Western Blots durchgeführt.

3.2.2 Vergleich der Methylierungsdaten von NSCLC-PatientInnen mit deren klinisch-pathologischen Charakteristika

PatientInnen mit ähnlichen Therapieformen in ähnlichen Krankheitsstadien und mit ähnlichen klinischen und pathologischen Merkmalen tragen unterschiedlich hohes Risiko zur Entwicklung eines Rezidivs [424]. Die Entwicklung spezifischer molekularer Marker für genauere Überlebens- bzw. Rezidivprognosen, aber auch zur Früherkennung und Risikoeinschätzung ist daher wünschenswert. Aus diesem Grund untersuchten wir auch einen eventuellen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus der Gene und klinisch-pathologischen Charakteristika wie Histologien, Rezidiventstehung und Überlebensraten.

4. Material und Methoden

4.1 NSCLC-PatientInnen und NSCLC-Zelllinien

Nach Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Medizinischen Universität Wien sowie Aufklärung der PatientInnen und Einholung der formellen Einverständniserklärung haben wir Primärtumorgewebe und korrespondierende nicht-maligne Lungengewebsproben von 97 PatientInnen mit NSCLC im Stadium I-III erhalten. Das Gewebe wurde während der Jahre 2000-2004 bei Operationen gewonnen. Die Lagerung der Gewebeproben erfolgte bei -80°C.

Eine Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Charakteristika der 97 NSCLC-PatientInnen ist in Tabelle 2 ersichtlich. Sie beinhalten Geschlecht, Alter, Histologie, Tumorstadium, Stadium des Lymphknotenbefalls, Gesamtstadium der Erkrankung, Auftreten eines Rezidivs (Rekurrenz des Tumors), krankheitsfreies Überleben (engl.: „disease-free survival“ oder DFS) und Gesamtüberleben (engl.: „overall survival“ oder OS).

Bei den untersuchten NSCLC-Zelllinien handelt es sich um A427, A549, NCI-H1915, NCI-H1993 und NCI-H2073, die von American Type Culture Collection (ATCC) bezogen wurden. Die Zelllinien wurden in Flüssigstickstoff bei -196°C gelagert.

Tabelle 2 Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Charakteristika der 97 NSCLC-PatientInnen. Unter den PatientInnen befinden sich keine Personen, die eine adjuvante Chemotherapie erhalten haben.

Variable	N	Variable	Bereich	Median
Geschlecht		Alter in Jahren	38-82	62
männlich	59	DFS in Monaten	1-84	39
weiblich	38	OS in Monaten	1-84	54
Histologie				
ADC	54			
SCC	39			
LCC	3			
NSCLC, NNS	1			
Krankheitsstadium ¹⁾				
I	48			
II	24			
III	25			
T-Stadium				
T1	24			
T2	48			
T3	20			
T4	5			
Lymphknoten-Stadium				
N0	58			
N1	22			
N2	17			
Rekurrenz der Krankheit				
JA	36			
I	18			
II	12			
III	6			
NEIN	61			

ADC: Adenokarzinom

SCC: Plattenepithelkarzinom

LCC: großzelliges Bronchialkarzinom

NNS: nicht näher spezifiziert

¹⁾ laut TNM-Klassifikation, 6. Edition

DFS (disease-free survival): krankheitsfreies Überleben; Zeitspanne von der Operation bis zum Auftreten eines Rezidivs bzw. bis zum letztmaligen Kontakt mit dem/der Patienten/in

OS (overall survival): Gesamtüberleben; Zeitspanne von der Operation bis zum letztmaligen Kontakt mit dem/der Patienten/in bzw. bis zu dessen/deren krankheitsassoziierten Ableben

4.1.1 Zellkultur

Zur Gewinnung von genomischer DNA aus Zelllinien müssen diese kultiviert werden. Bei den von uns untersuchten Zelllinien handelt es sich um adhärenente Zellen, die zunächst bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut wurden. Danach erfolgte der Transfer in 50 ml Falcon Tubes, wo die Zellsuspension 2 x mit Zellkulturmedium (15 ml, 37 °C) gewaschen wurde. Herstellung des 10%-igen Mediums (Stock):

- 450 ml RPMI 1640 (mit pH-Indikator)
- + 50 ml FBS (fötales Rinderserum, enthält zahlreiche Proteine, die u.a. Wachstum fördern)
- + 1 ml Refobacin (Breitband-Antibiotikum, besonders wirksam gegen gramnegative Bakterienreger)

Die oben genannten Waschschrte erfolgten jeweils durch 10-minütige Zentrifugation bei 1.520 rpm. Nach erneuter Zugabe von 15 ml Medium wurden die Zellen in Zellkulturflaschen transferiert. Es folgte die Kultivierung im Brutschrank unter folgenden Bedingungen: 37° C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit.

Das Wachstum der Zellen wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Gewünscht war eine Kolonisierung der adhärenenten Zellen am Boden der Zellkulturflasche. Bei einem Anwachsen der Zellen und ausreichend Platz für weitere Zellproliferation in der Flasche wurde das Medium mehrmals gewechselt (15 ml Medium für T25; je 25 ml Medium für T75 und T175). Bei zu geringer freier Fläche wurde eine Passage der Zellen in die nächstgrößere Zellkulturflasche notwendig:

Das Medium wurde abgeleert und 1-3 ml 5-%iges Trypsin-EDTA auf die Zellen pipettiert. Nach einigen Minuten Einwirkzeit hatten sich die Zellen ausreichend von der Gefäßwand gelöst und konnten in 50 ml Falcon Tubes mit 15 ml Medium transferiert werden, wo sie wieder 2 x durch Zentrifugation gewaschen wurden. Zum Schluss wurden die Zellen mit frischem Medium in die neue Zellkulturflasche pipettiert und im Brutschrank weiter kultiviert.

4.1.2 Behandlung von Zelllinien mit Aza-dC und TSA

Um die Auswirkung der Methylierung bestimmter Gene auf deren Proteinexpression zu untersuchen, wurden A549-Zellen mit dem Methyltransferase-Inhibitor Aza-dC bzw. mit dem Histondeacetylase-Inhibitor TSA 4 Tage lang behandelt.

Drei Zellkulturflaschen (T175) mit kultivierten A549-Zellen wurden vorbereitet (ca. 60 % konfluent). 1 mg Aza-dC wurde in 400 µl Medium aufgelöst; von dieser täglich neu formulierten Lösung kamen 4 Tage lang je 25 µl zu je 25 ml Zellkulturmedium. Am 4. Tag wurde einer Zellkultur zusätzlich 5 µl TSA zugesetzt. Unbehandelte A549-Zellen dienten als Kontrolle. Am 5. Tag erfolgte die Proteinisolierung (siehe 4.4.2).

Chemikalien:

Refobacin Ampullen, 40 mg (Merck, #112214)
FBS (Gibco, #10500-056)
RPMI 1640 Medium (Gibco, #61870-010)
Trypsin-EDTA 0,5% 10x (Gibco, #15400-054)
Zellkulturflaschen BD Falcon™ 175, 75 und 25cm² (#3112, #3136, #3108)
5-Aza-2'-Deoxycytidin (Sigma-Aldrich, #A3656)
Trichostatin A (Sigma-Aldrich, #T8552)

Hilfsmaterialien/Geräte:

Serologische Pipetten BD Falcon™ 25ml, 10ml 5ml, 1ml
Werkbank: Safe 2020 (Thermo Scientific)
BBD 6220 Heraeus Inkubatoren (Thermo Scientific)
Zentrifuge: Allegra X-22R (Beckman Coulter)
Inverses Mikroskop: Axiovert 40 (Zeiss)
Casy Cell Counter (Innovatis)

4.1.3 Isolierung genomischer DNA

Die genomische DNA wurde aus NSCLC-Zelllinien sowie gefrorenem NSCLC-Gewebe und korrespondierendem nicht-malignen Lungengewebe mittels Verdau durch Proteinase K, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI) und anschließender Ethanol-Präzipitation isoliert [425]. Die Lagerung der gereinigten DNA erfolgte bei -20°C.

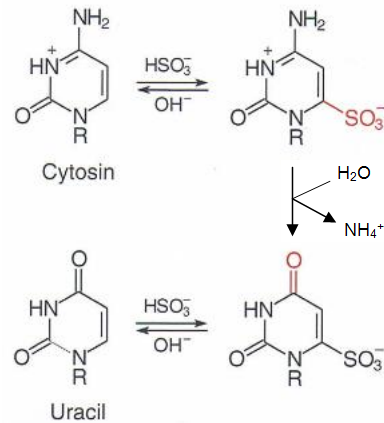
4.2 Etablierung der MS-HRM zur quantitativen Analyse von Methylierungen

Zur Bestimmung des Methylierungsstatus einzelner Gene wurden zunächst **methylierungssensitive, hochauflösende Schmelzkurvenanalysen (MS-HRM)** durchgeführt. Diese Methode kombiniert den Vorgang der Amplifikation und des Aufschmelzens der DNA mit der Bestimmung des Methylierungsgrades. Hierfür wurde die genomische DNA vorab mit **Natrium-Bisulfit behandelt**, um eine Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten Sequenzen zu ermöglichen. Weiters wurden für die MS-HRM **methylierungsinsensitive Primer** zur Amplifikation der gewünschten Region unabhängig von ihrem Methylierungsstatus entwickelt.

4.2.1 Natrium-Bisulfit-Behandlung der genomischen DNA

Im Laufe der DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wird das Methylierungsmuster der zu kopierenden DNA nicht mitübernommen. Aus diesem Grund war es notwendig, die zu untersuchende DNA vorab chemisch zu modifizieren. Die Modifikation erfolgte durch Natrium-Bisulfit-Behandlung [426, 427]. DNA-Denaturierung, nachfolgende Sulfonierung, Cytosin-Deaminierung durch Natrium-Bisulfit unter sauren Bedingungen mit abschließender Desulfonierung bilden die Basis für Konvertierungsvorgänge: Unmethylierte Cytosine werden durch die Bisulfitsalze in Uracil umgewandelt (und bei der darauffolgenden PCR zu Thymin konvertiert), methylierte Cytosine hingegen werden nicht umgewandelt (siehe Abb. 13 und 14). So entstehen Sequenzpolymorphismen abhängig vom Methylierungsstatus, die als Matrizen für die nachfolgende MS-HRM- bzw. Sequenzierungsanalysen zur Bestimmung des Methylierungsgrades und -musters herangezogen werden können.

Abbildung 13 Bisulfitkonvertierung von unmethyliertem Cytosin. Einzelsträngige, unmethylierte Cytosine werden durch Bisulfit (HSO_3^-) auf folgende Weise zu Uracilen deaminiert: Das C6-Atom des unmethylierten Cytosins wird zunächst sulfoniert. Anschließend erfolgt eine hydrolytische Entfernung der Aminogruppe am C4 des Cytosin-Bisulfit-Derivats. Durch alkalische Desulfonierung des Uracil-Bisulfit-Derivats erhält man schließlich Uracil. Der Konvertierungsvorgang ist abhängig von der Bisulfitkonzentration, dem pH-Wert und der Temperatur.



[428] modif., [14]

unmethylierte DNA



methylierte DNA

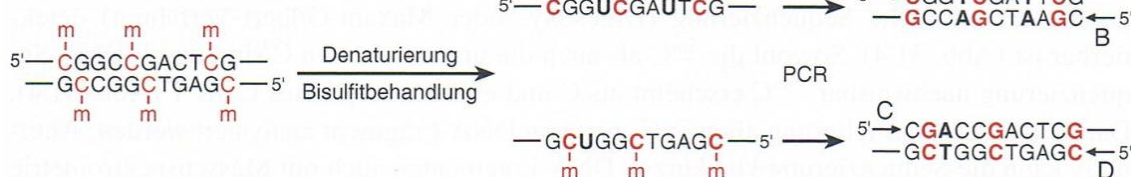


Abbildung 14 Natrium-Bisulfit-Behandlung genomischer DNA mit anschließender PCR. Nach Denaturierung der DNA werden unmethylierte Cytosine (C) durch Reaktion mit Bisulfit in Uracil (U) konvertiert, während 5-Methyl-cytosine keine chemische Reaktion aufweisen. Dadurch entsteht eine unterschiedliche Sequenzabfolge; die DNA-Stränge sind nicht mehr komplementär. Die modifizierte DNA kann nun mittels PCR unter Verwendung von unterschiedlichen Primern (A und B oder C und D), die komplementär zur deaminierten oder unveränderten DNA-Sequenz sind, amplifiziert werden. Dabei werden die Uracile durch Thymin (T) ersetzt, wodurch auf dem Komplementär-strang des PCR-Produkts Guanin (G), das sich ursprünglich gegenüber von C befindet, durch Adenin (A) ersetzt wird. 5-Methylcytosin wird zu C, auf dem Komplementärstrang befindet sich in der Folge (weiterhin) G.

[428] modif.

Durchführung:

Behandelt wurde genomische DNA aus den NSCLC-Zelllinien A427, A549, NCI-H1915, NCI-H1993 und NCI-H2073 und genomische DNA aus primärem Tumorgewebe sowie korrespondierendem nicht-malignen Lungengewebe von 97 NSCLC-PatientInnen (bezügl. DNA-Extraktion siehe 4.1.3). Zur Anwendung kamen EpiTect Bisulfite Kits von Qiagen nach dem Protokoll „Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA“. Zunächst wurde der Bisulfit-Mix aus dem Kit, der u.a. für den optimalen pH-Wert im Zuge der Konvertierung sorgt, mit 800 µl RNase freiem Wasser durch Vortexen gelöst und die erforderlichen Mengen an Ethanol abs. zu BW- und BD-Puffer des Kits zugegeben.

Konvertierung von unmethylierten Cytosinen durch Bisulfit:

Zur Durchführung der Behandlung wurden jeweils 1 µg DNA benötigt, in 200-µl-PCR-Tubes pipettiert und mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl Volumen aufgefüllt. Pro Probe erfolgte die Zugabe von 85 µl Bisulfit-Mix und 35 µl DNA Protect Buffer. Letzterer verhindert nicht nur die Fragmentation der DNA, sondern begünstigt auch die effektive DNA-Denaturierung (Auftrennung der DNA in Einzelstränge), die für eine erfolgreiche Cytosin-Konvertierung essentiell ist. Außerdem enthält er einen Farbstoff als Indikator zur Überprüfung des pH-Werts. Nach ausreichendem Durchmischen färbt sich die Flüssigkeit blau und ist bereit für das 5-stündige Konvertierungsprogramm im Thermocycler:

Vorgang	Zeit in min.	Temperatur in °C
Denaturierung	5	95
Inkubation	25	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	85	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	175	60
Halten	∞	20

← Durch wiederholte Denaturierungsvorgänge im Thermocycler wird die vollständige Konvertierung der unmethylierten Cytosine sichergestellt.

Aufreinigung der konvertierten einzelsträngigen DNA über eine Silika-Säule:

Der Inhalt aus den PCR-Tubes wurde in 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen (nachstehend als Eppis bezeichnet) überführt. Pro Probe wurde ein Mix aus 620 µl BL-Puffer und 6,2 µl Carrier RNA hergestellt, wovon jeder Probe 560 µl zugegeben wurden. BL-Puffer und Carrier RNA sorgen dafür, dass die konvertierte, einzelsträngige DNA auf die Silika-Membran in EpiTect Spin columns präzipitiert, auf welche die Mischungen nach dem Vortexen und Abzentrifugieren transferiert wurden. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für die Dauer einer Minute; diese und folgende Zentrifugationsschritte wurden bei 14.000 rpm durchgeführt.

Waschvorgang und Desulfonierung der DNA:

Das Filtrat wurde verworfen und je 500 µl BW-Puffer zur Entfernung des restlichen Natrium-Bisulfits auf die Säulen pipettiert. Nach einminütiger Zentrifugation wurde das Filtrat wieder weggeleert und den Proben je 500 µl BD-Puffer zur Entfernung der Sulfonylgruppen zugegeben. Darauf folgte eine Inkubationszeit von 15 min. bei Raumtemperatur (RT).

Waschvorgänge zur Entfernung des Desulfonierungsagens:

Nach erneuter einminütiger Zentrifugation wurden zum Zwecke der weiteren Entsalzung zweimal hintereinander je 500 µl BW-Puffer auf die Säule aufgetragen (mit Zentrifugation dazwischen), um nachfolgende PCR-Vorgänge nicht zu blockieren. Es erfolgte eine nochmalige Zentrifugation, das Filtrat wurde wieder verworfen und die Säulen in neue 2 ml Collection Tubes gegeben. Eine anschließende Zentrifugation für 3 min. wurde durchgeführt, um das restliche Ethanol zu entfernen.

Elution der reinen, konvertierten DNA:

Die Säulen wurden in neue 1,5 ml Eppis transferiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl EB-Puffer möglichst zentral auf die Membran, um die DNA zu eluieren. Nach einminütiger Zentrifugation wurden erneut 20 µl EB-Puffer zugegeben, letzte Zentrifugation für die Dauer einer Minute. Die modifizierte, gereinigte DNA wurde nach Konzentrationsmessung mittels NanoDrop 8000 mit Elutionspuffer auf 30 ng/µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

Chemikalien:

EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, #59104)
Ethanol abs. (Merck, #1.00983.1000)

4.2.2 Primerdesign für MS-HRM-Analysen

Nach der Natrium-Bisulfit-Behandlung sind die zwei DNA-Stränge zueinander nicht mehr komplementär. Daher können sie für die Methylierungsanalyse durch PCR mit unterschiedlichen Primern strangspezifisch amplifiziert werden (siehe auch Abb. 14).

Primer sind Oligonukleotide, die im Zuge der DNA-Amplifikation durch Basenpaarung an bestimmte Stellen der DNA-Matrize binden, damit der flankierende DNA-Abschnitt vervielfältigt wird. Das 3'-OH-Ende der Primer stellt dabei den Startbereich für die DNA-Polymerasen dar [429]. Deshalb wird beim Design des Primers nicht nur auf die optimale Länge des Primers (18-30 Nukleotide) und des resultierenden PCR-Produkts (90-170 Nukleotide) geachtet, sondern auch auf die Nukleotidsequenzen. Wichtig ist der GC-Gehalt: Da G und C durch drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind, sind diese Basenpaarungen stabiler als A-T-Basenpaarungen, die von nur zwei Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Die Schmelztemperatur des Primers hängt daher nicht nur von seiner Länge ab, sondern steigt auch mit der Anzahl seiner GC-Basenpaarungen.

Durchführung:

Die genomischen Sequenzen der zu untersuchenden Gene wurden der Ensembl-Datenbank entnommen (<http://www.ensembl.org>, Ausgabe 59). Nach Markierung der CpG-Insel beinhaltenden 5'-Promoterregion und Einfügen in die Software Methyl Primer Express® konnten Anzahl und Position von CpG-Dinukleotiden automatisiert bestimmt und das Design spezifischer Primer durchgeführt werden (siehe Abb. 15). Die gesuchten CpG-Inseln wurden mit einer Minimallänge von 300 bp festgelegt, das PCR-Amplikon mit einer Länge zwischen 90 und 170 bp bestimmt und das CG-Gehalt sollte 50 % ausmachen, damit der Grad der Methylierung aufgrund von PCR-Bias nicht unterschätzt wird. Für unsere nachfolgenden MS-HRM-Analysen wurden anschließend Sequenzen für „Bisulfite Sequencing Primer“ angefordert, kurz BSP genannt, die eine Amplifikation der gewünschten Region unabhängig von ihrem Methylierungsstatus ermöglichen. Pro zu untersuchender Promoterregion wurden 2-3 BSP-Paare bei der Firma VBC-Biotech Service GmbH, 1110 Wien, bestellt, um jenen mit der größten Spezifität/Effektivität mittels MS-HRM zu ermitteln (siehe 4.2.3 und 5.1.1). Aufbereitung der lyophilisierten Primer: Verdünnung mit ddH₂O entsprechend dem Synthesereport des Herstellers (Konzentration: 100 pmol/µl). Davon werden jeweils 20 µl forward Primer, 20 µl reverse Primer und 160 µl ddH₂O (Verdünnung: 1:10) zum Erhalt von Primerpaaren für die MS-HRM-Analysen gemischt.

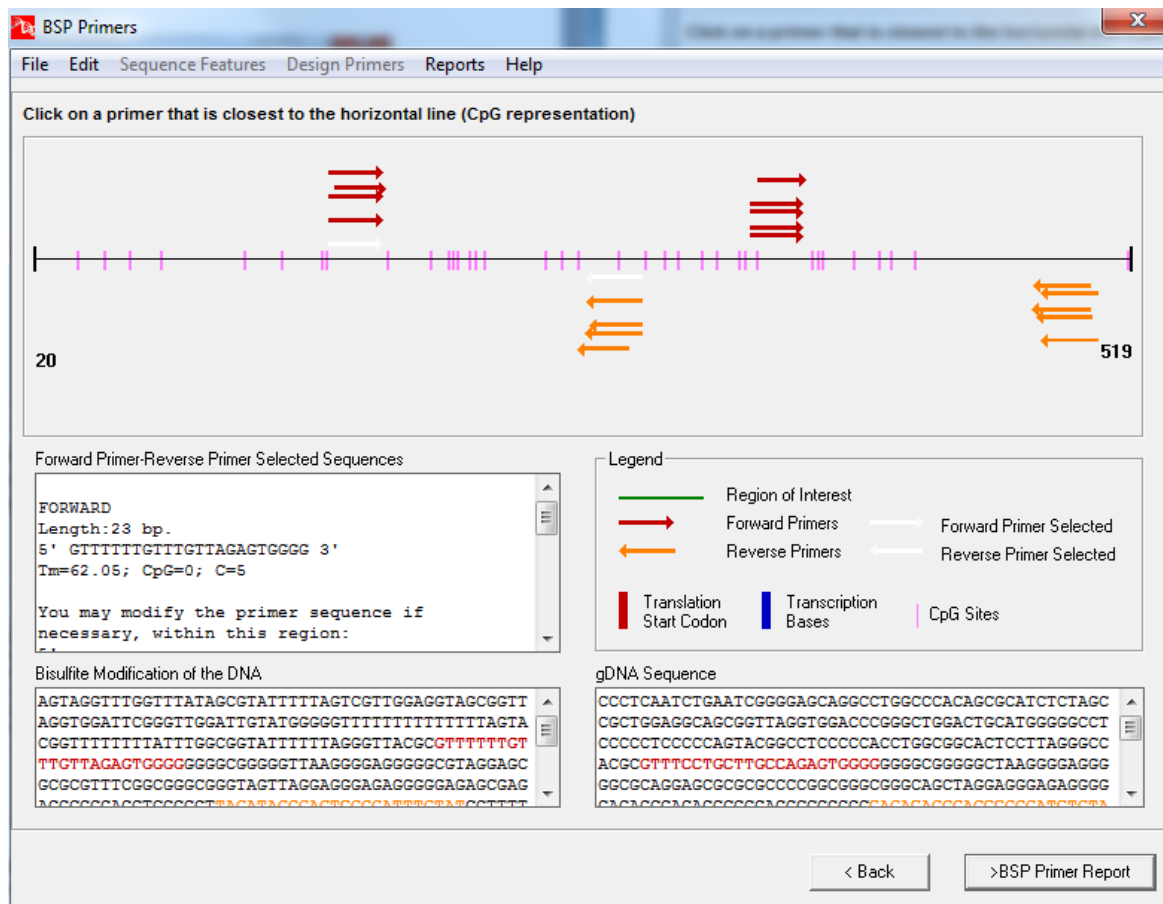


Abbildung 15 Beispielbild für Primerdesign mittels Methyl Primer Express®. Nach Eingabe der gewünschten Promotersequenz und Angabe der Auswahlkriterien (z.B. Größe der CpG-Inseln, Größe und CG-Gehalt des PCR-Produkts) sowie Auswahl des gewünschten Primers (BSP) werden die Optionen für Forward- und Reverse-Primer (rote und orange Pfeile) im Bereich der CpG-Insel angezeigt. Sequenzinformationen befinden sich im Bereich darunter.

Programm:

Methyl Primer Express® v1.0 (Applied Biosystems)

4.2.3 Methylierungssensitive, hochauflösende Schmelzkurvenanalysen (MS-HRM)

Die methylierungssensitive, hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM), die ursprünglich zur SNP-Genotypisierung entwickelt wurde, ermöglicht die quantitative Analyse von Einzelgen-Methylierungen [430]. Die Methode beruht auf der Amplifikation der zu untersuchenden, natriumbisulfit-behandelten DNA-Sequenz unabhängig von ihrem Methylierungsstatus durch methylierungs-unabhängige Primerpaare (bezügl. Primerdesign siehe 4.2.2) mit anschließender Schmelzkurvenanalyse der PCR-Fragmente durch Messung von Fluoreszenzveränderungen. Die Schmelzkurve hängt vom ursprünglichen Methylierungsgrad des Amplikons ab und wird mithilfe eines in die DNA interkalierenden und fluoreszierenden Farbstoffes im Zuge des Aufschmelzens der doppelsträngigen DNA (dsDNA) sichtbar gemacht (siehe Abb. 16 und 17).

In der vorangegangenen Natrium-Bisulfit-Behandlung der genomischen DNA wurden unmethylierte Cytosine zu Uracil konvertiert, während methylierte Cytosine unverändert geblieben sind (siehe 4.2.1).

Dies hat eine höhere Schmelztemperatur von methylierten PCR-Produkten aufgrund des höheren GC-Gehalts im Vergleich zu unmethylierter DNA zur Folge. Die sich daraus ergebenden unterschiedlichen Schmelzkurven erlauben eine Analyse des Methylierungsgrades (siehe Abb. 16). Bei dieser Technik handelt es sich um eine Methode, die es erlaubt, rasch und mit minimalem Probeneinsatz Gene, die mit der Krebsentstehung in Zusammenhang stehen könnten, in PatientInnen-DNA zu analysieren. Durch die hohe Sensitivität der Methode ist auch die Detektion geringer Methylierungsgrade möglich [431].

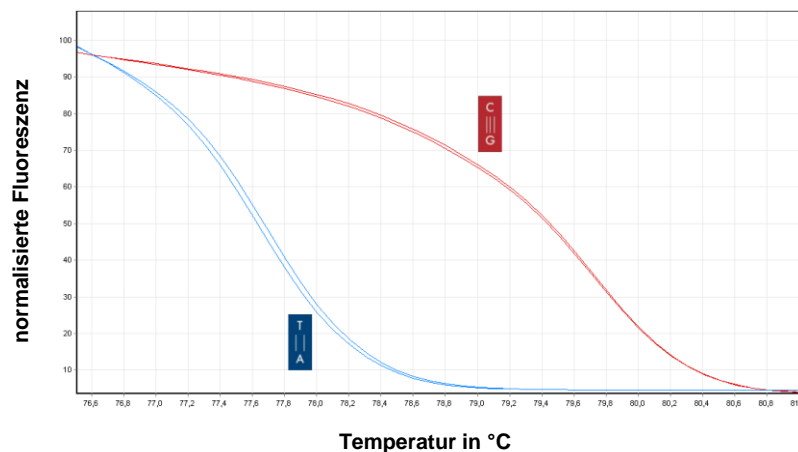


Abbildung 16 Methylierungssensitive, hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM). Die natriumbisulfit-behandelte DNA wird nach der Amplifikation mittels methylierungsunabhängiger Primer aufgeschmolzen. Ein in die DNA interkalierender Farbstoff fluoresziert, solange er noch in die dsDNA eingelagert ist, weshalb das Fluoreszenzsignal am Beginn der HRM-Analyse (bei niedriger Temperatur) noch stark ist. Mit dem Temperaturanstieg und fortschreitender Dissoziation der DNA in Einzelstränge wird der Farbstoff nach und nach freigegeben und das kontinuierlich gemessene Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit vom Methylierungszustand des PCR-Produkts schwächer: Methylierte DNA (rote Linien) enthält mehr GC-Basenpaarungen als unmethylierte DNA mit konvertierten Cytosinen (blaue Linien) und hat aufgrund der drei Wasserstoffbrückenbindungen eine höhere Schmelztemperatur. Auf diese Weise kann aus dem Verlauf der Schmelzkurven auf die Stärke der Methylierung geschlossen werden.

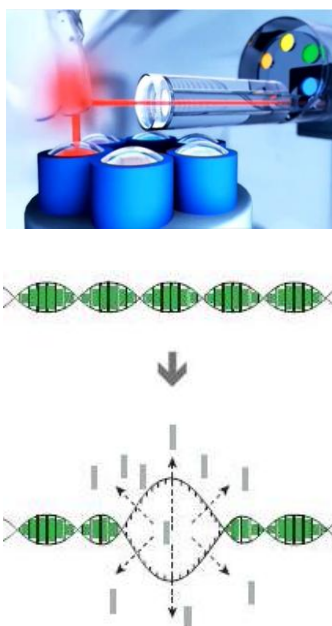


Abbildung 17 Thermo-optische Analysemethode zur quantitativen Bestimmung der DNA-Methylierung.

EvaGreen ist ein positiv geladener Farbstoff, der mit der negativ geladenen DNA interagiert und während der PCR zwischen die Nukleinbasen der dsDNA eingelagert wird. Auf diese Weise fungiert er als Marker, der durch Photonenanregung unterschiedlicher Wellenlänge ein messbares Fluoreszenzsignal abgibt. Aufgrund der Veränderungen der Signalintensität entstehen unterschiedliche Schmelzkurven. Durch den anschließenden Vergleich der Schmelzkurven können Sequenzvariationen zwischen PCR-Produkten bis hin zu Einzelbasenpaarveränderungen gemessen und Methylierungsunterschiede der untersuchten Proben detektiert werden.

Der Vorteil des Farbstoffes EvaGreen liegt u.a. darin, dass er die PCR nicht inhibiert und eine gleiche hohe Bindungsaffinität für GC-reiche wie für AT-reiche Regionen aufweist.

[432, 433] modif.

Durchführung:

Zur Anwendung kamen EpiTect HRM PCR Kits von Qiagen nach dem Protokoll „Analysis of CpG Methylation in Bisulfite Converted DNA“. Der Mastermix aus dem Kit enthält HotStarTaq Plus DNA Polymerase, PCR-Puffer, dNTPs sowie den fluoreszierenden Farbstoff EvaGreen.

Um die Methylierungsanalyse mittels MS-HRM zu optimieren, wurden zunächst die Primer auf ihre Spezifität und Effektivität überprüft. Hierfür wurden zu 100 % methylierte und zu 100 % unmethylierte Kontroll-DNA von Qiagen verwendet. Dabei handelt es sich um natrium-bisulfit-behandelte humane DNA in EB-Puffer (10mM Tris Cl) in einer verwendungsbereiten 10 ng/µl-Lösung. Durch Mischen der Kontroll-DNAs wurden Methylierungsstandards erstellt, sodass Kontrollen im Verhältnis zu 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 10 % und 0 % für die Methylierungsanalyse mittels MS-HRM zur Verfügung standen. Nach Ermittlung des optimalen Primerpaares (siehe 5.1.1) erfolgte die Untersuchung der NSCLC-Zelllinien A427, A549, NCI-H1915, NCI-H1993 und NCI-H2073 mittels MS-HRM (siehe 5.1.2). Im Anschluss daran konnte die quantitative Methylierungsanalyse für die 5'-Region der Gene *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* an den DNA-Proben von 97 NSCLC-PatientInnen durchgeführt werden (siehe 5.1.3).

Bei jedem HRM-Durchgang wurden die Methylierungsstandards verwendet; jede Untersuchung erfolgte als Duplex.

12,5 µl EpiTect HRM PCR Mastermix

1,9 µl Primermix

9,6 µl RNase freies H₂O

1 µl DNA *)

25 µl Reaktionsvolumen pro Tube
=====

*) 1 µl DNA entspricht:

- PatientInnen-DNA aus Tumor- sowie korrespondierendem nicht-malignen Lungengewebe oder
- Kontroll-DNA als Methylierungsstandards (100%, 75%, 50%, 25%, 10%, 0 %)

Zur Überprüfung einer etwaigen Kontamination erfolgte in zwei zusätzlichen Tubes pro Durchgang keine Zugabe von DNA.

Zur Durchführung der MS-HRM-Analysen wurde der Rotor-Gene Q von Qiagen verwendet (siehe Abb. 18 + Tab. 4).

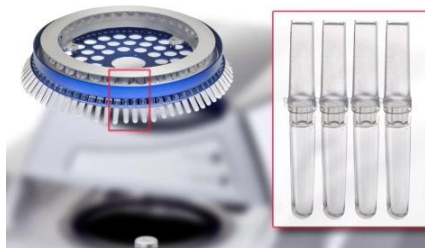


Abbildung 18 Rotor-Gene Q.

Links: MS-HRM wurde mittels Rotor-Gene Q durchgeführt. Zu den Vorteilen des Cyclers zählt die Entfernung von Luftbläschen durch Zentrifugation, wodurch auch vorangehende Zentrifugationsschritte unnötig sind. Zudem wird Kondensation verhindert. **Rechts:** Verwendet wurde die 72-Well-Rotor-Disc zur synchronen Analyse von bis zu 72 Proben mithilfe von 0,1 ml Strip Tubes mit Kappen.

[433]

Tabelle 4 Programmierung der MS-HRM.

Vorgang	Zeit in sec.	Temperatur in °C
PCR-Aktivierung	300	95
Denaturierung	10	95
Anlagerung (Annealing)	30	55
Elongation	10	72
HRM-Analyse	2	65-95

} 40 Zyklen

PCR: Die Anlagerung der methylierungsunabhängigen Primer erfolgt in Abhängigkeit von der Primerlänge, -sequenz und von der Reaktionstemperatur. Diese darf nicht zu hoch sein, damit die Anlagerung der Primer nicht behindert und die Amplifikation methylierter DNA nicht begünstigt wird. Sie darf aber auch nicht zu niedrig sein, um eine unspezifische Bindung des Primers an nicht-komplementäre Regionen zu vermeiden.

HRM-Analyse: Die Temperatur wird mit einem kontinuierlichen Anstieg um 0,1 °C von 65 °C auf 95 °C erhöht. Die DNA wird aufgeschmolzen und dabei werden Fluoreszenzsignale abgegeben.

[430]

Alle Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt. Der Erstellung der DNA-Schmelzkurven mit dem Rotor-Gene Q folgte eine Normalisierung der Daten gegen den zu 0 % methylierten Methylierungsstandard. Die bioinformatische Auswertung der normalisierten Schmelzkurven und Berechnung des Methylierungsgrades erfolgte jeweils durch Erstellung einer Regressionslinien-Analyse (siehe Abb. 26-35). Hierbei beschreibt der dimensionslose Korrelationskoeffizient R die Abhängigkeit zwischen zwei Merkmalen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 kann Werte zwischen -1 (kein linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Werten) und +1 (vollständig positiver Zusammenhang) annehmen. Eine detaillierte Auswertung der MS-HRM-Daten erfolgt in Kapitel 5 (Resultate).

Chemikalien:

Epitect HRM PCR Kit (Qiagen, #59445)

Epitect unmethylierte und methylierte humane Kontroll-DNA (Qiagen, #59655, #59665)

Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (Qiagen, #981103)

Programm:

Rotor-Gene Q Series Software 2.0.2

4.3 Genomische Bisulfitsequenzierung (BGS)

Die Bisulfitsequenzierung ist eine weitere Methode zur quantitativen Bestimmung des Methylierungsgrades und bietet als solche die detailliertesten Informationen zur Anzahl der methylierten CpGs innerhalb einer bestimmten DNA-Sequenz [426]. Hierfür erfolgte erneut das Design methylierungsinsensitiver Primer, um die natrium-bisulfit-behandelte PatientInnen-DNA mittels PCR amplifizieren zu können. Nach Aufreinigung der Gelprodukte konnte eine Klonierung der spezifischen Sequenzen und die nachfolgende Sequenzierung durchgeführt werden.

4.3.1 Primerdesign für die Bisulfitsequenzierung

Design und Aufbereitung der Primer für die Amplifizierung des BGS-Amplikons erfolgte wie in 4.2.2 beschrieben. Die Oligonukleotide sollten diesmal die im Zuge der MS-HRM untersuchten PCR-Produkte flankieren und das Amplikon eine Länge zwischen 200 und 400 bp haben. Die Primersequenzen, die für die Bisulfitsequenzierungsanalysen der PatientInnen-DNA verwendet wurden, sind in Tabelle 5 angeführt. Die jeweils optimale Annealing-Temperatur wurde anhand der Methylierungsstandards durch Gradientenbestimmung ermittelt.

Tabelle 5 Oligonukleotid-Sequenzen für genomische Bisulfitsequenzierung (BGS).

Gen	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')	Größe des Amplikons	Annealing-Temperatur
<i>EVX1</i>	GTGTTTYGTGGTTGTTTGAGTT	ATACAACCTCACCTCRATTTCTTCA	257 bp	55 °C
<i>HOXA9</i>	GGAGTTGGTTTTYGT	ACCAAAAAACAACCTAATCTCC	311 bp	56 °C
<i>IRX2</i>	AGTTGGGGTTTTAGGAATTTT	TTTTTCTAAATTAACCTCTTTCAA	252 bp	51 °C
<i>PCDHA12</i>	GAGGTTTTTATTTTTGTAATGGTG	AAATTTACCTCCAAAAAATCCC	255 bp	52 °C
<i>SFMBT2</i>	TTTTAYGGTGTAAGAGTGGAGG	ACCTTCTCTACCTTATCTCCCTAAA	228 bp	58 °C

Um die bevorzugte Amplifikation von methylierter oder unmethylierter DNA durch Primer mit CpGs zu vermeiden, werden an diesen Stellen Y oder R eingefügt:

Y in der Primersequenz: zufällige Integration von C oder T R in der Primersequenz: zufällige Integration von G oder A

Programm:

Methyl Primer Express® v1.0 (Applied Biosystems)

4.3.2 Amplifizierung und Purifikation der DNA

Durchführung:

Zunächst erfolgte die Amplifizierung der natrium-bisulfit-behandelten PatientInnen-DNA mittels PCR. Ausgewählt wurden Tumorproben sowie die korrespondierenden nicht-malignen Proben, welche anhand der MS-HRM-Untersuchungen einen deutlichen Methylierungsunterschied aufwiesen.

PCR-Ansatz:

13,1 µl Aqua dest. (AD)

3,2 µl dNTP

2,5 µl Puffer

1 µl Primer

0,2 µl Taq-Polymerase

20 µl Reaktionsvolumen pro PCR-Tube + 1 µl DNA

=====

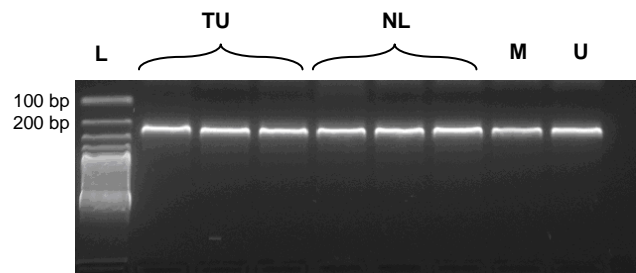
Programmierung des Thermocyclers:

Vorgang	Zeit	Temperatur in °C	
PCR-Aktivierung	12 min.	94	
Denaturierung	30 sec.	94	
Anlagerung (Annealing)	40 sec.	variabel je nach BSP (siehe Tab. 5)	} 40 Zyklen
Elongation	30 sec.	72	
	7 min.	72	

Die Gelelektrophorese wurde mit einem 2%igen Gel aus 100 ml 1x TAE-Puffer, 2 g LE Agarose und 5 µl Gelred™ durchgeführt. Befüllen des Gels: 6 µl DNA-Ladder in Slot 1, danach wurden je Slot 20 µl Probe mit 2 µl Ladebuffer (0,5% Bromphenolblau, 40 % Saccharose, 0,5 M EDTA pH 8,8, 10% SDS in ddH₂O) aufgetragen. Lauf bei 175 V, 20 min. Die Visualisierung erfolgte mittels des Geldokumentationsgerätes ChemiDoc™ XRS von Bio-Rad (siehe Abb. 19).

Abbildung 19 Gelelektrophorese nach Amplifikation von PatientInnen-DNA mit dem Primerpaar für *PCDHA12*.

L = 100 bp DNA-Ladder
 TU = DNA aus Tumorgewebe
 NL = DNA aus nicht-malignem Lungengewebe
 M = methylierte Kontroll-DNA
 U = unmethylierte Kontroll-DNA



Die gesuchten Banden wurden unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten, in je ein Eppi für die DNA aus Tumortroben und die DNA aus nicht-malignem Lungengewebe transferiert und für den Extraktionsvorgang abgewogen. Zur Anwendung kamen nun QIAquick® Gel extraction Kits nach dem Protokoll „QIAquick Gel Extraction Kit Protocol“ aus dem QIAquick Spin Handbuch.

Zu je 1 Teil Agarosegel mit DNA wurden je 3 Teile QG-Puffer (indiziert einen pH von ≤7,5) dazugegeben. Es folgte Inkubation für 15 min. auf dem Thermoschüttler bei 50 °C. Anschließend wurde je 1 x das Gelvolumen der DNA in Form von Isopropanol zugegeben und die Mischung auf Säulen in 2 ml Collection Tubes aufgetragen. Erneut folgte eine Zentrifugation für 1 min. bei 13.000 rpm. 0,5 ml QG-Puffer und 0,75 ml mit Ethanol versetztem PE-Puffer wurden hintereinander auf die Säule aufgetragen, dazwischen erfolgten jeweils eine Zentrifugation und das Verwerfen des Durchflusses. Nach dem Übertragen der Säulen in 1,5 ml Eppis wurden je 30 µl Elutionspuffer auf die Membran pipettiert. Nach einer Ruhezeit von ca. 2 Minuten und einem weiteren einminütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm lag die gereinigte DNA im Eluat vor.

Chemikalien:

dNTP Set (100mM, 4x25µmol) (GE Healthcare/Amersham, #28-4065-51)
 Hot-Star Taq DNA-Polymerase und Puffer (Qiagen, #203205)
 Aqua dest.: Aqua B. Braun (Braun, Deutschland, #14322; Meditrade, #114990)

LE Agarose (Biozym, #840004)
 TAE-Puffer 50x (Bio-Rad, #161-0743)
 GelRed™ 10.000x (Biotrend, #41003)
 DNA Ladder 100bp (Invitrogen, #15628-019)
 Bromphenol Blue Sodium Salt (Sigma-Aldrich, #B5525)
 Sucrose (Sigma-Aldrich, #S7903)
 SDS-Lösung 10% (Sigma-Aldrich, #L4522)
 Qiaquick Gel extraction Kit (Qiagen, #28704)
 Isopropanol (Merck, #1.09634.1011)
 Ethanol abs. (Merck, #1.00983.1000)

Geräte:

Power Supply: Enduro 300V (Labnet Int.)
 Elektrophoresekammern: StarPhoresis Long und Wide Long Horizontal Gel System (STARLAB); GeneMate/ISC Bioexpress

4.3.3 Klonierung und Sequenzierung

Um identische Kopien vom gewünschten DNA-Fragment in großer Zahl zu erhalten, wurde die in 4.3.2 extrahierte DNA durch Klonierung selektiv vermehrt (siehe Abb. 20).

Die TA-Klonierung erfolgte mittels eines durch Topoisomerase I „aktivierten“ TA-Vektors. Es handelt sich hierbei um eine effektive Methode der Klonierung durch direkte Insertion von Taq-Polymerase-amplifizierter DNA in ein Plasmid.

Nach der Transformation in *E. coli* und Kultivierung der Zellen in LB-Agarplatten erfolgte die Analyse der Kolonien für den finalen Sequenzierungsprozess.

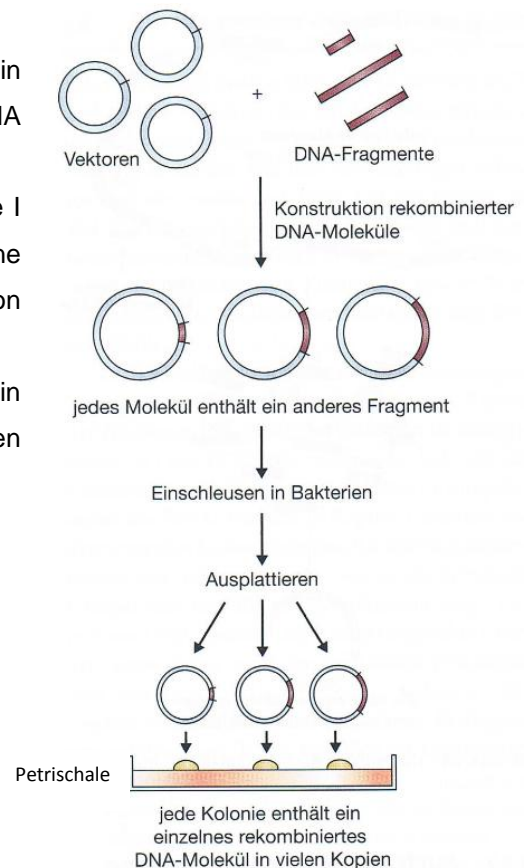


Abbildung 20 Klonierung zur Herstellung und Vervielfältigung rekombinanter DNA für die Sequenzierungsanalyse.

Ziel der Klonierung ist es, nach Einschleusen der gewünschten DNA-Sequenz in den Vektor und anschließende Transformation in kompetente Bakterien möglichst rasch viele Kolonien mit fehlerfrei aufgenommener Plasmid-DNA zu erhalten.

[434]

Die lineare Amplifikation der DNA für die Sequenzierung erfolgte mit M13-Primern. Es wurden je 3 Klone von der DNA aus Primärtumoren und von der DNA aus korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben zur Sequenzierung an LGC Genomics, D-12459 Berlin, eingesandt.

Durchführung:

Zunächst wurden ein Kanamycin-Stock (50 mg/ml) und LB-Agarplatten für die spätere Kultivierung der Zellen hergestellt. Zutaten für LB-Medium:

Bacto Trypton	10 g
Yeast Extract	5 g
Agar	15 g
NaCl	5 g
1 M NaOH	1 ml

aufgefüllt auf 1 L ddH₂O und Vermengung mittels Magnetrührer auf der Thermowaage

Anschließend wurde das Medium für 25 min. bei 120 °C autoklaviert. Unter Verwendung eines Magnetrührers wurde das Abkühlen auf ca. 50 °C abgewartet, dann **Kanamycin** in Verhältnis 1:1000 zugegeben, um zu gewährleisten, dass auf dem Agarmedium später nur die gesuchten Rekombinanten und keine anderen Zellen wachsen können. Aus diesem Grund ist es notwendig, dass der verwendete Vektor ein Resistenzgen gegen dieses Antibiotikum besitzt (siehe Abb. 21).

Das LB-Medium wurde in sterile Petrischalen gegossen und nach dem Polymerisieren bis zum Gebrauch luftdicht verpackt auf 4 °C gelagert.

Für die Klonierung kam das TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing von Invitrogen zur Anwendung. Der pCR4-TOPO-Vektor im Kit besteht aus 10 ng/µl Plasmid-DNA in 50 % Glycerol, 50 mM Tris-HCL, pH 7,4 (bei 25°C), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,1 % Triton X-100, 100 µg/ml BSA, 30 µM Phenolrot.

Für die Klonierung der in 4.3.2 amplifizierten und extrahierten DNA wurde folgendes Reaktionsvolumen aus den Komponenten des TOPO TA Cloning Kits gemixt (pro Probe):

4 µl DNA
+ 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl + 0,06 M MgCl₂)
+ 1 µl pCR4-TOPO-Vektor

6 µl Reaktionsvolumen pro Eppi

Anschließend erfolgte eine Inkubationszeit von ca. 15 min bei RT (Zirkulierung des Vektors). Hierbei kommt es zur Ligation des Vektors mit dem PCR-Produkt, das in unserem Fall 228-311 bp groß ist.

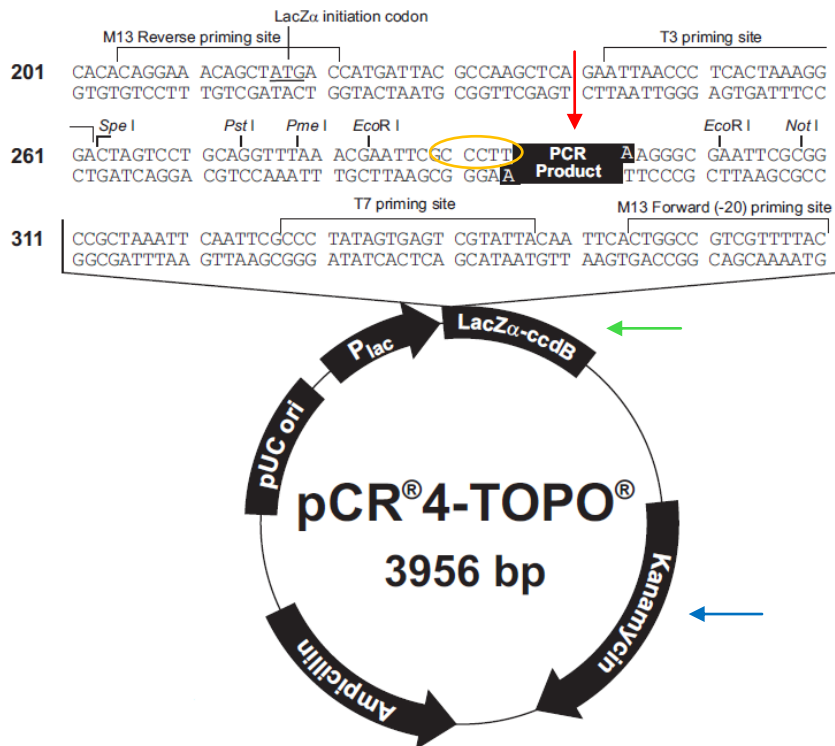


Abbildung 21 pCR® 4-TOPO Vektor. Der fast 4 kB große Klonierungsvektor wurde mittels Topoisomerase I linearisiert und erlaubt eine rasche Klonierung von PCR-Produkten mit glatten Enden ganz ohne Ligase. Dabei wird die terminale Transferaseaktivität der Taq-Polymerase ausgenutzt. Das Enzym hat im Zuge der vorangegangenen PCR die Base Adenosin an das 3'-Ende des PCR-Produktes angefügt, wodurch ein A-Überhang entstanden ist. Dadurch kann die DNA direkt in die Polylinker-Region des linearisierten Vektors, die einen 3'-T-Überhang aufweist, kloniert werden (roter Pfeil). Topoisomerase I erkennt die Schnittstelle C/T CTT (orange Markierung) und bindet mittels Phosphotyrosinbindung kovalent an das 3'-Ende des Strangbruchs. Der TOPO-Vektor enthält zwei benachbarte Schnittstellen; Selbstligation wird aufgrund Blockierung durch Topoisomerase verhindert. Der Vektor besitzt u.a. das Kanamycin-Resistenzgen (blauer Pfeil). Weiters verfügt er über das letale E.coli-Gen *ccdB*, das sich am C-Terminus des LacZα-Fragments befindet (grüner Pfeil), wodurch eine positive Selektion von Transformanten stattfindet: Eine Ligation des PCR-Produktes unterbricht die Expression des Fusionsgens LacZα/*ccdB* und resultiert in Wachstum von ausschließlich positiven Rekombinanten nach der Transformation. Zellen mit nicht-rekombinanten Vektoren sterben beim Ausplattieren ab. Der Vektor enthält zudem speziell designte Sequenzierungs-Primerstellen (M13, T7, T3).

[435]

Um eine effiziente und stabile Replikation der Plasmid-DNA zu erreichen, wurden pro Probe 2 µl in je ein Röhrchen mit One Shot TOP10 Zellen transferiert. Es handelt sich dabei um chemisch kompetente Bakterien vom Stamm E. coli (Genotyp F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG λ-) zur Durchführung des Transformations-schrittes. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 15 min. bei 4 °C.

Nach einem 30-sekündigen Hitzeschock in einem auf 42 °C erwärmten Wasserbad erfolgte die Zugabe von jeweils 250 µl S.O.C. Medium, das als Nährmedium zur Regeneration der Zellen beitragen und eine maximale Transformationseffizienz gewährleisten soll. Danach kamen die Eppis für ca. 1 h in einen Thermomixer (Mix bei 300 rpm). Im Anschluss daran wurden die transformierten Zellen in unterschiedlichen Volumina (20-100 µl) auf den vorbereiteten Agarplatten mittels Pasteurpipetten ausplattiert und über Nacht im Bakterienbrutschrank bei 37 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Kolonien auf frischen Agarplatten unter Markierung/Beschriftung der Areale verteilt und für einige Stunden in den Brutschrank gegeben. Anschließend wurden die unterschiedlichen Klone mittels PCR und Gelelektrophorese auf deren Insert untersucht. PCR-Ansatz und Gellauf erfolgte wie in 4.3.2, statt 1 µl DNA wurden die kultivierten Zellen mittels autoklavierten Zahnstochern in die PCR-Tubes transferiert.

Von jenen Klonen mit korrektem Insert und den stärksten Banden wurden Klone für die nachfolgende Sequenzierung ausgewählt. Die ausgewählten Klone (jeweils 3 pro NSCLC-Gewebe und korrespondierendem nicht-malignen Lungengewebe) wurden für die Sequenzierung in Eppis mit Agarosegel aufgetragen und an LGC Genomics, D-12459 Berlin, eingesandt.

Chemikalien:

Bacto Trypton (BD, #211705)
Bacto Hefeextrakt (BD, #212750)
Bacto Agar (BD, #214010)
Natriumchlorid (Sigma-Aldrich, #S3014)
Natriumhydroxid (Sigma-Aldrich, #S8045)
Zellkulturschalen BD Falcon™ 100x20mm (BD Biosciences, #353003)
Kanamycin (Sigma, #K1876)
S.O.C. Medium (Invitrogen, #15544-034)
TOPO TA Cloning Kit pCR4-TOPO vector (Invitrogen, #K4575-01)
One Shot® Top10 Chemically Competent E.coli (Invitrogen, #C4040-03)

4.4 Western Blot zur Überprüfung der Proteinexpression

Im Anschluss an die Ermittlung der Methylierungsgrade von Tumor- und nicht-malignen Geweben von 97 NSCLC-PatientInnen wurde die Auswirkung der Methylierung auf der Ebene der Proteinexpression untersucht. Hierfür erfolgte ein Vergleich des Expressionsmusters von *SFMBT2* in den NSCLC-Zelllinien A427, A549, NCI-H1915, NCI-H1993 und NCI-H2073 mit dem Expressionsmuster des Gens in nicht-malignem Lungengewebe (siehe 5.4). Weiters wurde ein Expressionsvergleich zwischen der unbehandelten und der mit Aza-dC und/oder TSA behandelten Zelllinie A549 angestellt. Für diese Untersuchungen war zunächst die Isolierung der Proteine aus dem Lungengewebe bzw. den Zelllinien notwendig.

4.4.1 Proteinisolierung aus gefrorenem nicht-malignem Lungengewebe

Für die Isolierung von Proteinen aus nicht-malignem Lungengewebe wurde pro Probe ein 1,5 ml Eppi mit 300 µl Protein-Extraktionsreagens und aliquot 12 µl 25x Proteaseinhibitor vorbereitet. Je 50 bis 100 mg Gewebe wurden in gefrorenem Zustand in einem Mörser mit Flüssigstickstoff zerkleinert (mit Waschgang nach jeder Probe!) und mit einem Spatel in das Eppi übertragen. Nach einer Wirkzeit von ca. 15 min. unter permanentem Schwenken erfolgte die Zentrifugation bei 14.000 rpm (Microfuge 18, Beckman Coulter) für 15 min. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden in neue 1,5 ml Eppis transferiert und bei -80 °C gelagert.

4.4.2 Proteinisolierung aus Zellpellets

Das Zellpellet im 50 ml Falcon Tube wurde durch Auf- und Abpipettieren mit 1x PBS gewaschen, um Medienzusätze wie Phenolrot und andere inhibierende Substanzen zu entfernen, und bei 4.500 rpm (Rotina 420R, Hettich) für 15 min. zentrifugiert. Nach dem Ableeren des PBS-Restes wurde das Pellet je nach Größe in 100-500 µl Protein-Extraktionsreagens und aliquot 25x Proteaseinhibitor resuspendiert. Nach 10-minütigem Schwenken wurden die lysierten Zellen nochmals für 15 min. bei 4.500 rpm zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden in neue 1,5 ml Eppis transferiert und bei -80 °C eingefroren.

4.4.3 Messung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um den Erfolg der Proteinisolierung zu überprüfen und beim nachfolgenden Western Blot gleiche Mengen an Proteinen einsetzen zu können, bedienten wir uns der Bradford-Methode [436]. Dabei handelt es sich um eine schnelle und sensitive kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Hierbei kommt der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) zum Einsatz, mithilfe dessen sich Proteinmengen zwischen 1 und 25 µg/ml bestimmen lassen. Der Farbstoff bindet in saurer Umgebung an die kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine, wobei ein Photometer die Farbintensität bei bestimmter Wellenlänge und abhängig von der Proteinkonzentration misst.

Zur Anwendung kam der Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit. Zu Beginn wurde eine Kalibrierung des Testverfahrens mit dem Standardprotein Rinderalbumin (BSA) mit bekannter Konzentration durchgeführt, um die Proteinkonzentrationen später vergleichen zu können. Hierfür wurde das BSA laut Anleitung verdünnt (siehe Tab. 6). Im Anschluss daran wurden neun Eppis mit je 1,5 ml Bradford-Reagens aus dem Kit befüllt und je 30 µl von den Mixen A bis I dazugegeben. Mittels Küvetten erfolgten die photometrischen Messungen in einem BioPhotometer und Erstellung einer Standardkurve (siehe Abb. 22). Durch die Komplexbildung des Coomassie-Brillantblau-Farbstoffs mit Proteinen ändert die Flüssigkeit ihre Farbe von rötlich/braun auf blau und das Absorptionsmaximum des Farbstoffs verschiebt sich von 465 nm zu 595 nm. Diese Farbverschiebung wird bei 595 nm photometrisch gemessen, da bei dieser Wellenlänge der größte Unterschied zwischen den beiden Farben besteht, und ist abhängig vom Gehalt an aromatischen Aminosäuren.

Tabelle 6 Verdünnung der BSA-Standards.

Eppi	Volumen des Verdünnungsmittels	Volumen des BSA	finale BSA-Konzentration	Absorbanz
A	0	300 µl vom Stock	2,000 µg/ml	1,424
B	125 µl	375 µl vom Stock	1,500 µg/ml	1,289
C	325 µl	325 µl vom Stock	1,000 µg/ml	1,050
D	175 µl	175 µl der Lösung B	750 µg/ml	0,867
E	325 µl	325 µl der Lösung C	500 µg/ml	0,641
F	325 µl	325 µl der Lösung E	250 µg/ml	0,398
G	325 µl	325 µl der Lösung F	125 µg/ml	0,212
H	400 µl	100 µl der Lösung G	25 µg/ml	0,056
I	400 µl	0	0 µg/ml = Blank	0,000

Nach Erstellung der Verdünnungsreihe von BSA wurde die Absorbanz mittels Photometer ermittelt (rechte Spalte).
 BSA-Konzentration: 2 mg/ml in einer wässrigen 0,9%igen NaCl-Lösung mit 0,05% Natriumazid
 Verdünnungsmittel: M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent
 Blank: Blindprobe, die keinen Analyt enthält

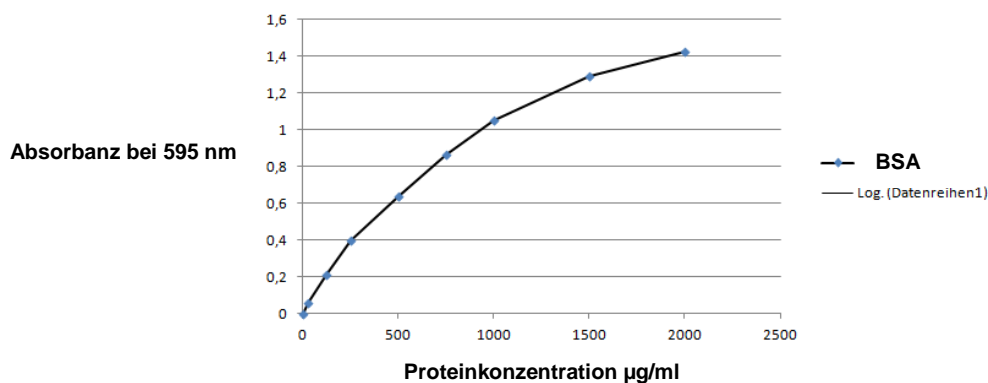


Abbildung 22 Eichkurve von BSA. Anhand der mit den aus Standardwerten ermittelten Eichkurve lässt sich der gesuchte Proteingehalt der zu bestimmenden Probe aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit der Standardkurve ablesen bzw. berechnen.

Die Verdünnung der BSA-Standards und der Proteine erfolgte mit M-Per Proteinextraktionsreagens im Verhältnis 1:51.

Chemikalien:

M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, #78501)
 Protease-Inhibitor: cOmplete (Roche Diagnostics, #172310)
 PBS-Lösung 10x (Sigma-Aldrich, #P5493)
 Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23200)

Hilfsmaterialien/(Geräte:

Uvette® 220-1600 nm (Eppendorf, #952010051)
 Biophotometer (Eppendorf)

4.4.4 Western Blot

Beim Western Blot oder Immunblot werden die Proteine zunächst bei einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend durch Blotten auf eine Trägermembran übertragen. In unserem Fall erfolgte die Übertragung semi-dry, d.h., in einer Blot-Vorrichtung mit Plattenelektroden in horizontaler Konfiguration. Die auf diese Weise auf die Membran transferierten Proteine sind so für weitere Untersuchungen zugänglich und können durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern auf die Expression bestimmter Gene untersucht werden.

Zuerst erfolgte die Herstellung aller notwendigen Puffer und (Stock-)Lösungen.

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8:

6 g Tris base + 60 ml ddH₂O

Mit 6 M HCl auf pH 6,8 gebracht. Mit ddH₂O aufgefüllt auf 100 ml. Lagerung bei 4 °C.

Laemmli Puffer (= Sample Buffer) laut Bedienungsanleitung „Mini-Protean Tetra Cell“ von Bio-Rad:

3,55 ml ddH₂O

1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

2,5 ml Glycerol

2 ml 10 % SDS

0,2 ml 0,5 % Bromophenol Blue Lagerung bei RT

Laufpuffer (Running Buffer) = 10x Elektrodenpuffer, pH 8,3:

30,3 g Tris base

+ 144 g Glycin

+ 10 g SDS

Mit Magnetrührer auf 70° C, bis gelöst. Mit ddH₂O aufgefüllt auf 1000 ml. Lagerung bei RT.

Transferpuffer, pH 9,2:

laut Bedienungsanleitung „Trans-Blot SD Semi-Dry electrophoretic transfer cell“ von Bio-Rad:

5,82 g Tris base

2,93 g Glycin

3,75 ml 10 % SDS

200 ml Methanol

Mit ddH₂O aufgefüllt auf 1000 ml. Lagerung bei 4°C.

10x TBS:

500 ml 1M Tris pH 7,4

300 ml 5 M NaCl

200 ml ddH₂O

TBS-T:

1000 ml 1 x TBS

1 ml Tween 20

5 % Milk-TBS-T (Blocking Solution):

100 ml 1 x TBS-T

5 g Trockenmilchpulver

Vorbereitung der verdünnten Proteine aus Normalgewebe:

NL1 (c=0,688 µg/µl)

NL2 (c=1,02 µg/µl)

NL3 (c=1,358 µg/µl)

Vorbereitung der verdünnten Proteine aus Zelllinien:

A427 (c=0,970 µg/µl)

H1993 (c=0,722 µg/µl)

A549 (c=1,653 µg/µl)

H2073 (c=1,580 µg/µl)

H1915 (c=0,768 µg/µl)

Vorbereitung der verdünnten Proteine aus mit Aza-dC und TSA (un)behandelten Zelllinien:

A549 Ko (c=1,603 µg/µl) = unbehandelte Zelllinie A549

A549 Aza (c=1,243 µg/µl) = mit Aza-dC behandelte Zelllinie A549

A549 Aza+TSA (c=1,806 µg/µl) = mit Aza-dC und TSA behandelte Zelllinie A549

→ je 10 µg vom Protein wurden je 2 x für die SDS-Page benötigt
(zur Detektion des gesuchten Antigens und zur Kontrolle)

SDS-Page:

Vor jedem Gellauf wurde die benötigte Menge Laemmli-Puffer mit 5 % β-Mercaptoethanol versehen und jede Probe im Verhältnis von mind. 1:2 mit diesem Puffer verdünnt. Danach wurden die Proben für 5 min. auf 95 °C erhitzt. Gemeinsam mit dem Detergens SDS, das den Proteinen eine negative Ladung verleiht und β-Mercaptoethanol, das die Disulfidbrückenbindung aufbricht, sorgt dieser Schritt für eine Denaturierung und Linearisierung der Proteine und erlaubt die Auftrennung nach ihrer Kettenlänge, die mit der Molekularmasse korreliert, im Trennmedium (Gel). Dieses ist aus einem Sammelgel, in dem die negativ geladenen Proteine aufkonzentriert werden, und einem Trenngel, wo die eigentliche Auftrennung stattfindet, zusammengesetzt.

Das Fertiggel Mini-PROTEAN® TGX™ (12 %, 10-well comb, 30 µl) von Bio-Rad wurde in Elektrophorese-Kammern eingespannt und mit Laufpuffer bedeckt. Dieser fungiert als Elektrolyt, der durch Anlegen einer Spannung elektrischen Strom leitet. Marker sowie Proben wurden anschließend nach folgendem Schema auf das Precast-Gel aufgetragen:

Slot 1	Slot 2	Slot 3	Slot ...	Slot ...	Slot ...
M	Probe 1	Probe 2		M	Probe 1	Probe 2
5 µl	10 µg	10 µg		5 µl	10 µg	10 µg

Als Proteinmarker wurde der Precision Plus Protein WesternC Standard von Bio-Rad verwendet (siehe Abb. 23). Der Gellauf erfolgte für ca. 30 min. bei 15 V (bei zwei Gelen 25 V).

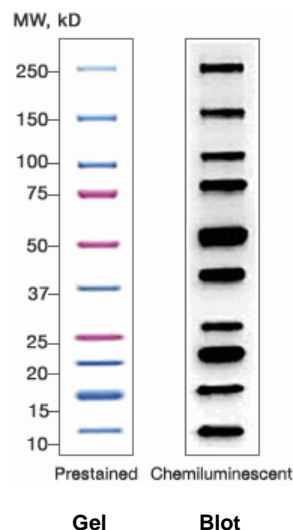


Abbildung 23 Precision Plus Protein WesternC Standard.

Der Marker besteht aus Proteinen bekannter Größe, ist vorgefärbt und gibt nach Auftrennung der Proteine blaue bis violette Banden im Gel und auf der Membran. Zudem enthält er eine *Strep*-tag-Sequenz, die eine chemilumineszente Detektion des gesuchten Proteins mittels StrepTactin-HRP nach der Antikörper-Reaktion erlaubt.

Zum immunologischen Nachweis der Proteine im Fertiggel wurden folgende Schritte zur Vorbereitung des Blots gesetzt, wobei die Wasch-, Blocking- und Inkubationsvorgänge auf einem Schüttler erfolgten: Das Gel kam für 10 min. in den Transferpuffer, die PVDF-Membran wurde für 3 sec. in Methanol, danach 2 min. in ddH₂O und 7 min. in Transferpuffer geschwenkt. Das auch im Transferpuffer enthaltene Methanol entfernt SDS von den Proteinen, das deren Ladung beeinflusst. Der Blot-Vorgang erfolgte für 30 min. bei 200 V in der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell von Bio-Rad (siehe Abb. 23).

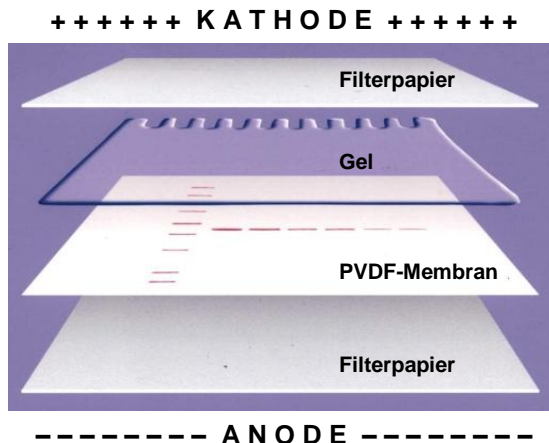


Abbildung 24 Aufbau eines Western Blots nach der Semi-Dry-Variante. Das Gel wird auf die PVDF-Membran gelegt, beide gemeinsam sind zwischen Filtern im Transferpuffer eingebettet. Durch die angelegte Spannung werden die Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihrer Position im Gel auf die Membran übertragen. Es besteht eine starke hydrophobe Wechselwirkung zwischen Membran und Proteinen, sodass letztere fixiert werden und eine Inkubation mit Antikörpern möglich wird.

[437] modif.

Nach dem Blotten erfolgte ein 10-minütiger Waschgang der Membran in ddH₂O, um Gelreste zu entfernen; u.U. wurde die Membran für unterschiedliche Inkubationsvorgänge durchtrennt. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch einstündiges Schwenken in 5%-iger Milk-TBS-T-Lösung blockiert und vor der Behandlung mit Antikörpern nochmal 3 x 5 min. in TBS-T gewaschen. Während der Inkubation der Membran in der ersten Antikörper-Lösung richtet sich der Antikörper (AK) spezifisch gegen das gesuchte, auf der Membran fixierte Protein – sofern vorhanden. Der zweite AK wiederum, der aus einer anderen Spezies als der Primärantikörper stammt und mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert wurde, detektiert bestimmte Bereiche des ersten AKs und bindet an diesen. Zum einen wird durch die doppelte Bindung von Antikörpern eine Signalverstärkung erreicht, zum anderen wird das gesuchte Protein mittels HRP durch eine Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht.

Inkubationen von Proben mit **SFMBT2**-Antikörper:

Primär-AK:	Anti-SFMBT2 produced in rabbit, Verdünnung 1:200 mit 5%-Milk-TBS-T
Sekundär-AK:	Anti-Rabbit IgG HRP produced in goat, Verdünnung 1:80000 mit 5%-Milk-TBS-T + StrepTactin-HRP (1:20000)

Kontrolle:

Primär-AK:	Anti-beta-Actin produced in rabbit, Verdünnung 1:2000 mit 5%-Milk-TBS-T
Sekundär-AK:	Anti-Rabbit IgG HRP produced in goat, Verdünnung 1:80000 mit 5%-Milk-TBS-T + StrepTactin-HRP (1:20000)

Zur Detektion von SFMBT2 wurde der polyklonale Prestige Antikörper vom Human Protein Atlas Projekt (HPA, www.proteinatlas.org) gewählt. Dieser war für immunhistochemische Methoden entwickelt und u.a. auch auf Western-Blot-Anwendungen getestet worden. Auf der Website von HPA wird die demnach zu erwartende atomare Masse von SFMBT2 mit 100,6 kDa angegeben, allerdings gleichzeitig darauf hingewiesen, dass die Angaben betreffend Western-Blot-Analysen unsicher sind und Resultate je nach Experiment und weiterer Optimierung abweichen können.

Inkubation der Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3 x in TBS-T gewaschen (1 x 5 min., 2 x 10 min.). Die anschließende Inkubation der Sekundärantikörper erfolgte für 1 h bei RT. Abschließend wurden die finalen Waschgänge durchgeführt: 3 x in TBS-T (1 x 5 min., 2 x 10 min.), 3 x in TBS (1 x 5 min., 2 x 10 min.).

Sichtbarmachung der HRP-Detektion erfolgte im Geldokumentationsgerät: Die Membranen wurden zwischen Klarsichthüllen platziert, ein Reaktionsansatz von je 300 µl Luminol/Enhancer und Peroxidlösung vermischt und über die Membran getropft sowie gleichmäßig verteilt. Die Peroxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, wodurch es sich im angeregten Zustand befindet. Fällt es wieder in seinen Grundzustand zurück, wird sichtbares Licht emittiert. Bei einer Detektionszeit von 2000 sec. im ChemiDoc XRS wurden 15 Fotos in regelmäßigen Intervallen gemacht.

Chemikalien:

Tris pure (Biomol, #50005)
Salzsäure rauchend 37% (Merck, #1003171000)
Glycerol (Sigma-Aldrich, #G8773)
SDS-Lösung 10% (Sigma-Aldrich, #L4522)
Bromphenolblau (Sigma, B0126-25G)
Fluka-Glycin (Sigma-Aldrich, #50046)
SDS (Sigma-Aldrich, #L4390)
Trizma Hydrochloridlösung 1M, pH 7,4 bzw. pH8 (Sigma-Aldrich, #T2663 bzw. #T3038)
NaCl 5M (Ambion, #AM9759)
Tween 20 (Bio-Rad, #170-6531)
Non Fat Dry Milk (Bio-Rad, 100-04504-MSDS)
beta-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, #M7154)
Precision Plus Protein Western C Standard (Bio-Rad, #161-0376)
Mini-Protean TGX Precast Gels, 12% (Bio-Rad, #456-1043)
Methanol (Sigma-Aldrich, #270474)
Extra Thick Blot Paper, Mini Blot Size (Bio-Rad, #1703966)
Immun-Blot PVDF (Bio-Rad, #162-0177)
Immun-Star WesternC Chemilumineszenz Kit (Bio-Rad, #170-5070)
Anti-SFMBT2 (Sigma Prestige Antibodies, HPA035448)
Anti-Rabbit IgG HRP (Sigma, A9169)
Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate (Bio-Rad, #161-0380)
Bio-Safe Coomassie Stain (Bio-Rad, #161-0786)

Hilfsmaterialien/Geräte:

Impulsschweißgerät TP-400 (TrendPack, #1111400000)
Schlauchfolie 150 mm breit 50 my Stärke (TrendPack, #16515053)
Mini-Protean Tetra cell (Bio-Rad)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad)
ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad)
Power Supply Western Blot: Power Pac Universal 500V 2.5A, 500W und Power Pac HC, 250V, 3.0A, 300W (Bio-Rad)

4.5 Verwendete Materialien, Geräte und Programme allgemein

Pipetten: Eppendorf Research Pipetten 1000µl, 200 µl, 20µl, 10µl
Pipettenspitzen: Safe Seal Tips professional, 1250µl, 200µl, 20µl, 10µl
(Biozym, #770600, #770210, #770050, #770010)

Autoklav: MultiControl (CertoClav)
pH-Meter: Lab 860 (Schott Instruments)
Schüttler: 3015 Kreis (GFL)
Vortexer: Ika Vortex Genius 3 (IKA)
Thermomixer: Thermomixer comfort (Eppendorf)
Thermocycler: vapo.protect (Eppendorf)
Wasseraufbereiter: Milli-Q (Millipore)
Spectrophotometer: NanoDrop 8000 (Thermo Scientific)
Zentrifugen: Rotina 420R und Mikro 22R (Hettich)
Allegria X-22R und Microfuge 18 (Beckman Coulter)
Waagen: RET control/t IKAMAG safety control (IKA)
Scout Pro 2000g (Ohaus)
Excellence XS205 (Mettler Toledo)

1,5 ml und 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße
PCR Single Cap 8er SoftStrips 0,2 ml (Biozym, #710980)
Glaspasteurpipetten (VWR, #612-1702)
50 ml Polypropylene Conical Tube, 30x115 mm style (Becton Dickinson Labware)
15 ml Centrifuge Tubes, Centristar Cap (Corning Incorporated)

Microsoft Office Excel 2007
Microsoft Office Word 2007
Windows 7 Paint
SPSS Statistics 17.0

5. Resultate

5.1 Ergebnisse der MS-HRM-Analysen

5.1.1 Test der entwickelten BSP-Primerpaare

Die bestellten Primerpaare wurden vor der Durchführung der MS-HRM-Analysen der PatientInnen-DNA anhand der Methylierungsstandards auf Ihre Spezifität/Effektivität überprüft. Wichtig waren eine gleichmäßige Amplifikation der Methylierungsstandards und sichtbare Unterschiede im Schmelzprofil (siehe Abb. 25). Die Primersequenzen, die für die Analysen der PatientInnen-DNA verwendet wurden, sind in Tabelle 3 angeführt.

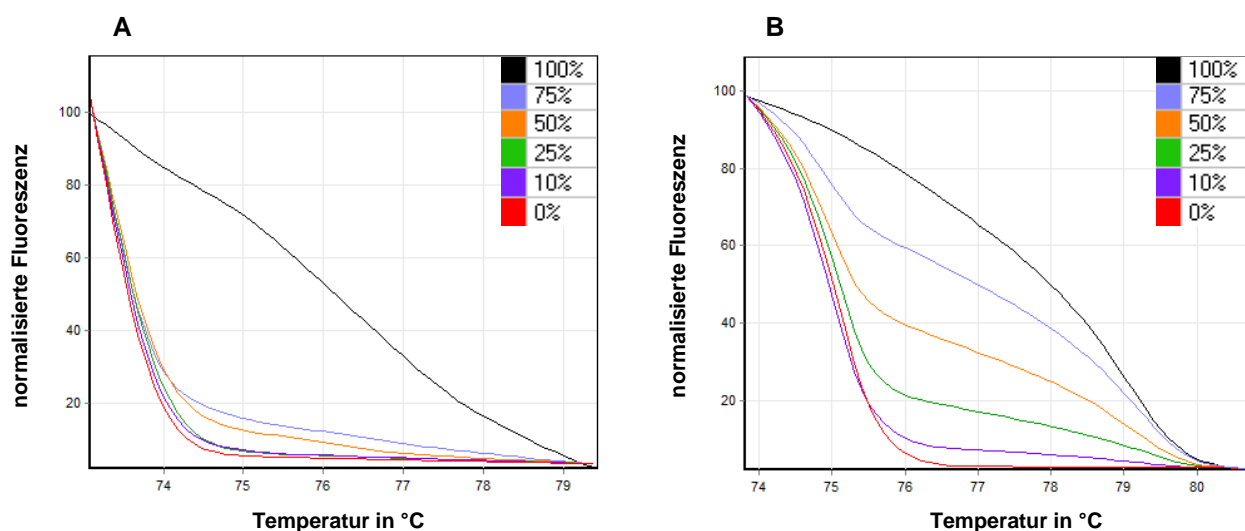


Abbildung 25 Primertest am Beispiel von *HOXA9* mit Methylierungsstandards.

A Die Grafik zeigt eine ungleichmäßige Aufteilung der Kurven im Schmelzprofil. Der für diesen Test verwendete *HOXA9*-Primer kann nicht für weitere MS-HRM-Analysen verwendet werden.
B Die Standardkurven zeigen eine gleichmäßige Auflösung der Methylierungsgrade von 0 bis 100 %. Der Primer ist somit für die MS-HRM-Analysen der PatientInnen-DNA geeignet.

Tabelle 3 Oligonukleotid-Sequenzen für MS-HRM-Analyse.

GEN	PRIMER forward (5'-3')	PRIMER reverse (5'-3')	Größe des Amplikons	Annealing-Temperatur in °C
<i>EVX1</i>	GGTAGATGGATTYGTAGGTAG	CTACTAAATTACCCCTATCCRA	129 bp	55
<i>HOXA9</i>	AGGGGATTTATTTTAAGAAGTGA	TAACCTCTTACCTTAACACATTTCC	138 bp	55
<i>IRX2</i>	GTTGGGGTTTTAGGAATTTT	CCTAAAACCTCCCAATCAC	165 bp	55
<i>PCDHA12</i>	TTTTGGAGGTAAATTTGTAGAA	CCTCCAAATAAATACTACACTCC	102 bp	55
<i>SFMBT2</i>	AAATTGGTTTTTTATTAATGGTTT	AACCTTCTCTACCTTATCTCCCTA	146 bp	55

Um die bevorzugte Amplifikation von methylierter oder unmethylierter DNA durch Primer mit CpGs zu vermeiden, werden an diesen Stellen Y oder R eingefügt:

Y in der Primersequenz: zufällige Integration von C oder T R in der Primersequenz: zufällige Integration von G oder A

5.1.2 Ergebnis der MS-HRM-Analyse von NSCLC-Zelllinien

Bevor die MS-HRM-Assays zur Analyse von PatientInnen-DNA verwendet werden konnten, musste ihre Qualität in Vorversuchen getestet werden. MS-HRM-Analysen für die Gene *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* wurden entwickelt und an natrium-bisulfit-behandelter genomischer DNA der NSCLC-Zelllinien A427, A549, NCI-H1915, NCI-H1993 und NCI-H2073 und Methylierungskontrollen (mit Methylierung zu 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 10 % und 0 %) getestet.

Die Amplifikation sämtlicher Proben erfolgte bei vergleichbaren cycle-threshold-Werten (Ct-Werten), die als theoretische Größe den Anfang des exponentiellen Wachstums einer Kurve beschreiben und bei der Quantifizierung von DNA-Molekülen mittels quantitativer Echtzeit-PCR zu berücksichtigen sind.

Die MS-HRM-Analyse von fünf Genen in NSCLC-Zelllinien zeigte, dass die Gene *EVX1*, *HOXA9* und *PCDHA12* in den fünf Zelllinien A427, A549, H1915, H1993 und H2073 stark methyliert sind (33 - 100 % Methylierung). *SFMBT2* liegt weiters in den Zelllinien A427, A549 und H1993 methyliert vor und ist in H1915 sowie H2073 nicht methyliert. *IRX2* weist in den Zelllinien A427, A549 sowie H1915 ebenso eine Methylierung auf, während der Methylierungsstatus in den Zelllinien H1993 und H2073 nicht bestimmt werden konnte.

Grafische Darstellungen der Methylierungsergebnisse finden sich in den Abbildungen 26-30.

Gen: *EVX1*

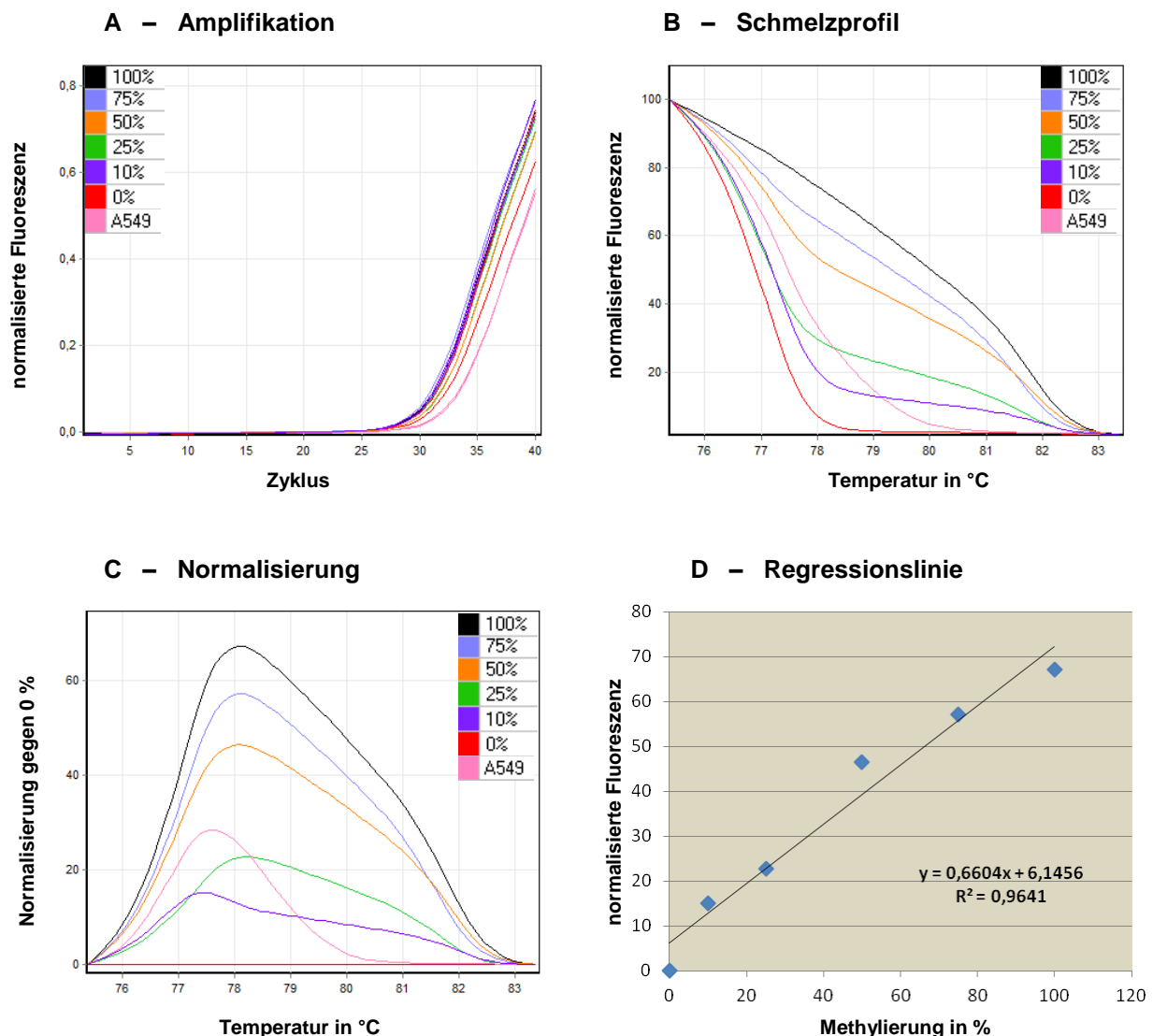


Abbildung 26 MS-HRM-Analyse von *EVX1* in NSCLC-Zelllinien. Die Analyse wurde in Duplikaten durchgeführt.

A-C: Die Abbildungen zeigen Amplifikation, Schmelzprofil und Normalisierungsplot der Methylierungsstandards sowie der Zelllinie A549. Dargestellt werden die geometrischen Mittelwerte der Duplikate.

A – Amplifikationsplot: Die Amplifikation der Proben erfolgte bei vergleichbaren Ct-Werten. **B – Schmelzprofil:** Die Schmelztemperatur hängt vom Ausmaß der Methylierung der Probe ab. Das Schmelzprofil zeigt eine gute Auftrennung der Methylierungsstandards nach ihrem Methylierungsgrad (0 - 100 %). **C – Normalisierungsplot:** Die HRM-Daten wurden gegen 0 % methylierte Kontroll-DNA normalisiert. Die Höhe der Peaks (= Fluoreszenz-Höchstwerte) hängt vom Prozentsatz der Methylierung ab. **D – Regressionslinie:** Anhand der Schmelzkurven kann der Prozentsatz der Methylierung nach einer Normalisierung der Daten errechnet werden. Die Peaks der Proben wurden dem Prozentsatz der Methylierung der Standards gegenüber gestellt. Zur Berechnung des Methylierungsprozentsatzes dient die Geradengleichung $y = 0,6604x + 6,1456$. Sie wird umgeformt zu $x = (y - 6,1456) / 0,6604$; y entspricht der Peakhöhe der Probe im Normalisierungsplot. Der Korrelationskoeffizient R^2 repräsentiert (bei einem Idealwert von +1) für jedes Gen den linearen Zusammenhang zwischen den untersuchten Proben. $R^2 = 0,964$ weist auf eine hohe Linearität der Methylierungsstandards für die HRM-Analyse von *EVX1* hin.

Wir konnten Methylierung von *EVX1* in allen fünf NSCLC-Zelllinien beobachten. Die Zelllinie H1993 wies mit 83,59 % die stärkste Methylierung auf, der geringste Methylierungsgrad war bei der Zelllinie A549 mit 33,65 % festzustellen.

Probe	Fluoreszenz MW	Methylierung in %
A427	43,52	56,59
H1915	56,03	75,53
H1993	61,35	83,59
H2073	58,18	78,79
A549	28,37	33,65

Gen: *HOXA9*

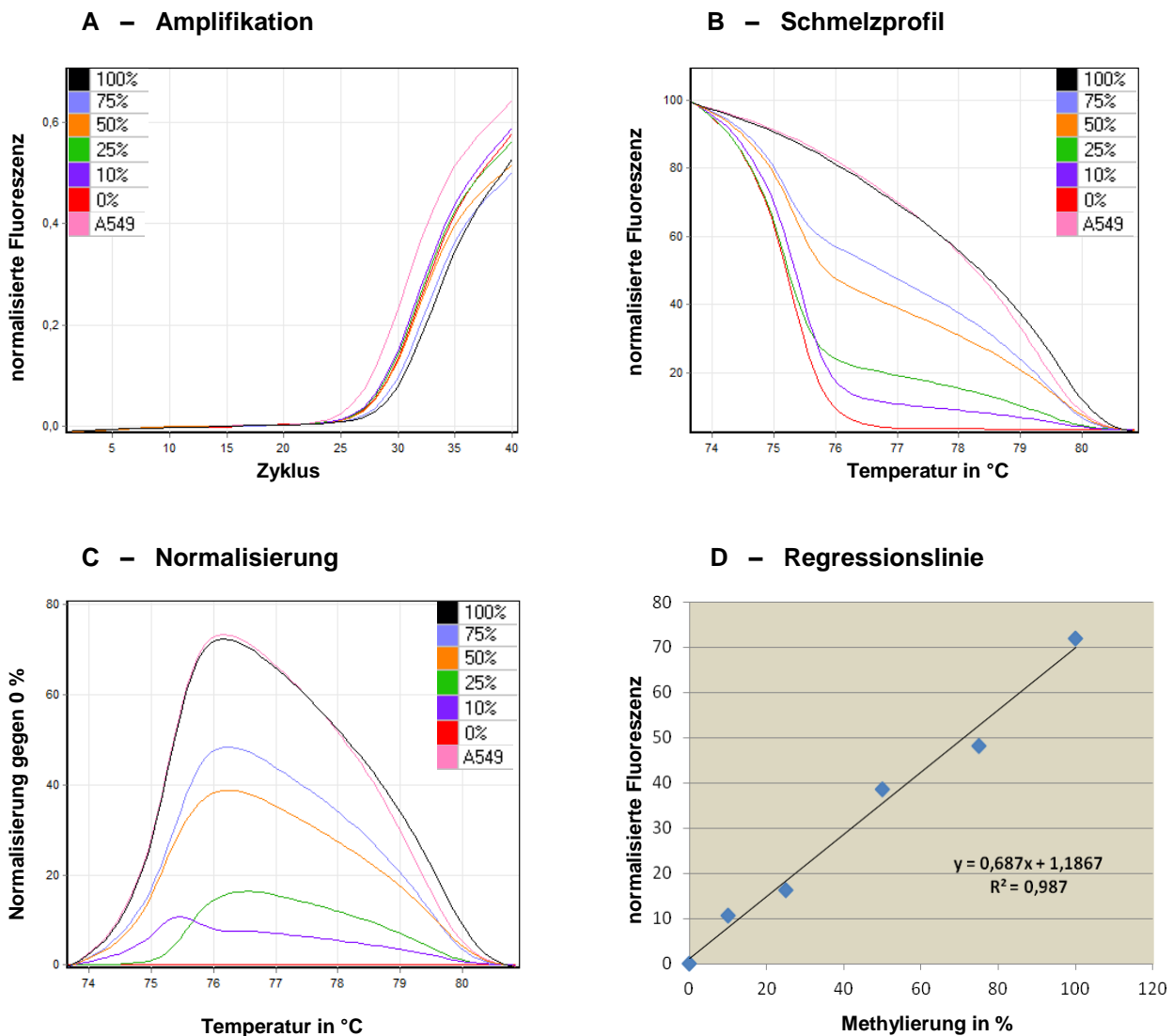


Abbildung 27 MS-HRM-Analyse von *HOXA9* in NSCLC-Zelllinien. Die Analyse wurde in Duplikaten durchgeführt.

A-C: Die Abbildungen zeigen Amplifikation, Schmelzprofil und Normalisierungsplot der Methylierungsstandards sowie der Zelllinie A549. Dargestellt werden die geometrischen Mittelwerte der Duplikate.

A – Amplifikationsplot: Die Amplifikation der Proben erfolgte bei vergleichbaren Ct-Werten. **B – Schmelzprofil:** Die Schmelztemperatur hängt vom Ausmaß der Methylierung der Probe ab. Das Schmelzprofil zeigt eine gute Auftrennung der Methylierungsstandards nach ihrem Methylierungsgrad (0 - 100 %). **C – Normalisierungsplot:** Die HRM-Daten wurden gegen 0 % methylierte Kontroll-DNA normalisiert. Die Höhe der Peaks (= Fluoreszenz-Höchstwerte) hängt vom Prozentsatz der Methylierung ab. **D – Regressionslinie:** Anhand der Schmelzkurven kann der Prozentsatz der Methylierung nach einer Normalisierung der Daten errechnet werden. Die Peaks der Proben wurden dem Prozentsatz der Methylierung der Standards gegenüber gestellt. Zur Berechnung des Methylierungsprozentsatzes dient die Geradengleichung $y = 0,687x + 1,1867$. Sie wird umgeformt zu $x = (y - 1,1867) / 0,687$; y entspricht der Peakhöhe der Probe im Normalisierungsplot. Der Korrelationskoeffizient R^2 repräsentiert (bei einem Idealwert von +1) für jedes Gen den linearen Zusammenhang zwischen den untersuchten Proben. $R^2 = 0,987$ weist auf eine hohe Linearität der Methylierungsstandards für die HRM-Analyse von *HOXA9* hin.

HOXA9 liegt mit einem Wert von > 90 % in allen fünf NSCLC-Zelllinien stark methyliert vor.

Probe	Fluoreszenz MW	Methylierung in %
A427	63,42	90,58
H1915	64,12	91,60
H1993	67,40	96,38
H2073	66,64	95,27
A549	73,15	104,75

Gen: *IRX2*

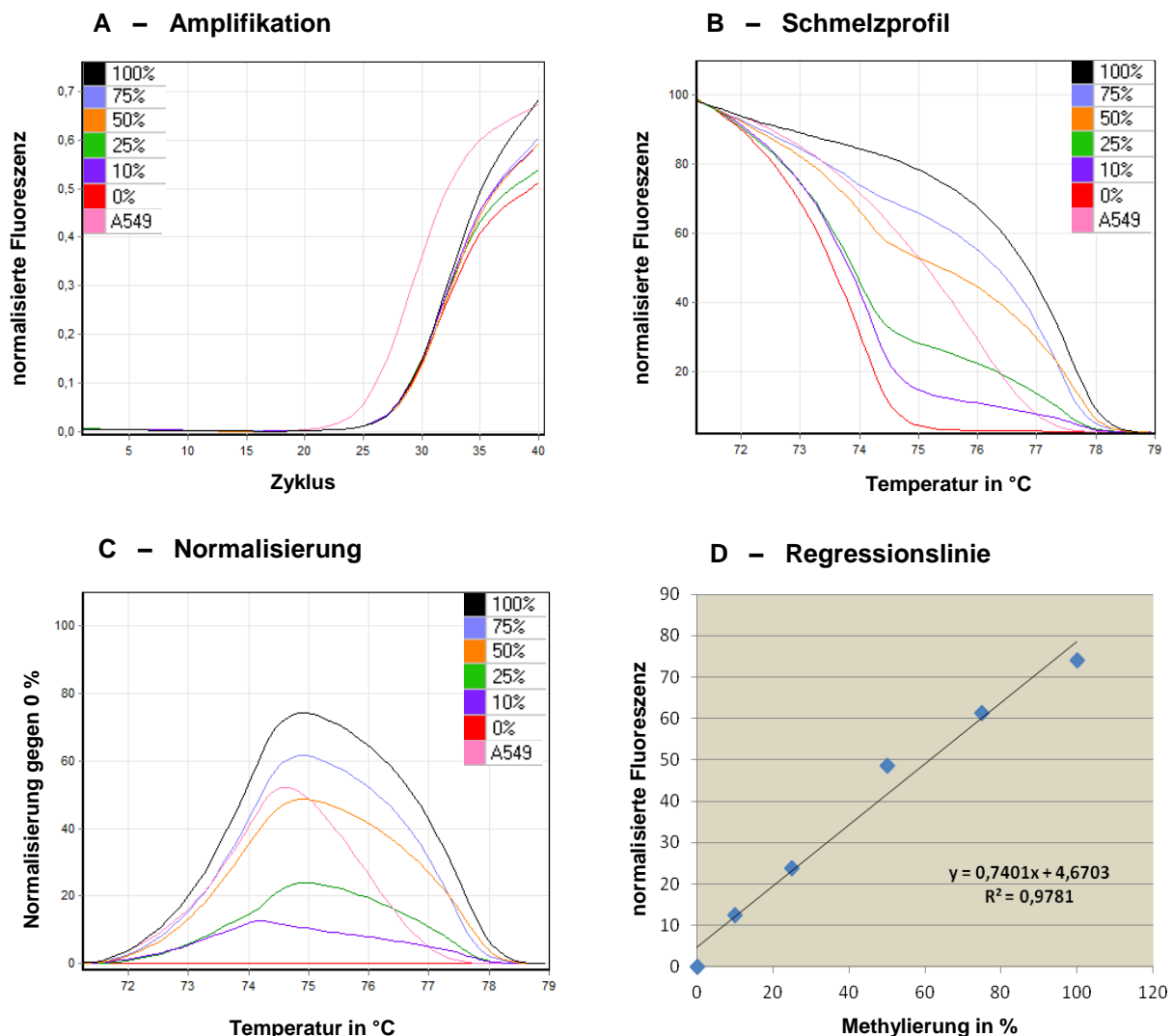


Abbildung 28 MS-HRM-Analyse von *IRX2* in NSCLC-Zelllinien. Die Analyse wurde in Duplikaten durchgeführt.

A-C: Die Abbildungen zeigen Amplifikation, Schmelzprofil und Normalisierungsplot der Methylierungsstandards sowie der Zelllinie A549. Dargestellt werden die geometrischen Mittelwerte der Duplikate.

A – Amplifikationsplot: Die Amplifikation der Proben erfolgte bei vergleichbaren Ct-Werten. **B – Schmelzprofil:** Die Schmelztemperatur hängt vom Ausmaß der Methylierung der Probe ab. Das Schmelzprofil zeigt eine gute Auftrennung der Methylierungsstandards nach ihrem Methylierungsgrad (0 - 100 %). **C – Normalisierungsplot:** Die HRM-Daten wurden gegen 0 % methylierte Kontroll-DNA normalisiert. Die Höhe der Peaks (= Fluoreszenz-Höchstwerte) hängt vom Prozentsatz der Methylierung ab. **D – Regressionslinie:** Anhand der Schmelzkurven kann der Prozentsatz der Methylierung nach einer Normalisierung der Daten errechnet werden. Die Peaks der Proben wurden dem Prozentsatz der Methylierung der Standards gegenüber gestellt. Zur Berechnung des Methylierungsprozentsatzes dient die Geradengleichung $y = 0,7401x + 4,6703$. Sie wird umgeformt zu $x = (y - 4,6703) / 0,7401$; y entspricht der Peakhöhe der Probe im Normalisierungsplot. Der Korrelationskoeffizient R^2 repräsentiert (bei einem Idealwert von +1) für jedes Gen den linearen Zusammenhang zwischen den untersuchten Proben. $R^2 = 0,978$ weist auf eine hohe Linearität der Methylierungsstandards für die HRM-Analyse von *IRX2* hin.

IRX2 ist in der Zelllinie H1915 mit 91,96 % am stärksten methyliert und weist die geringste Methylierung in A427 mit 33,81 % auf. Eine Auswertung der Zelllinien H1993 und H2073 konnte aufgrund fehlerhafter Fluoreszenzsignale nicht durchgeführt werden. Dennoch ist der *IRX2*-Primer für Analysen der PatientInnen-DNA geeignet, wie anhand der Methylierungsstandards und der Zelllinien A427, H1915 und A549 gezeigt wurde.

Probe	Fluoreszenz MW	Methylierung in %
A427	29,70	33,81
H1915	72,73	91,96
H1993	–	–
H2073	–	–
A549	52,19	64,20

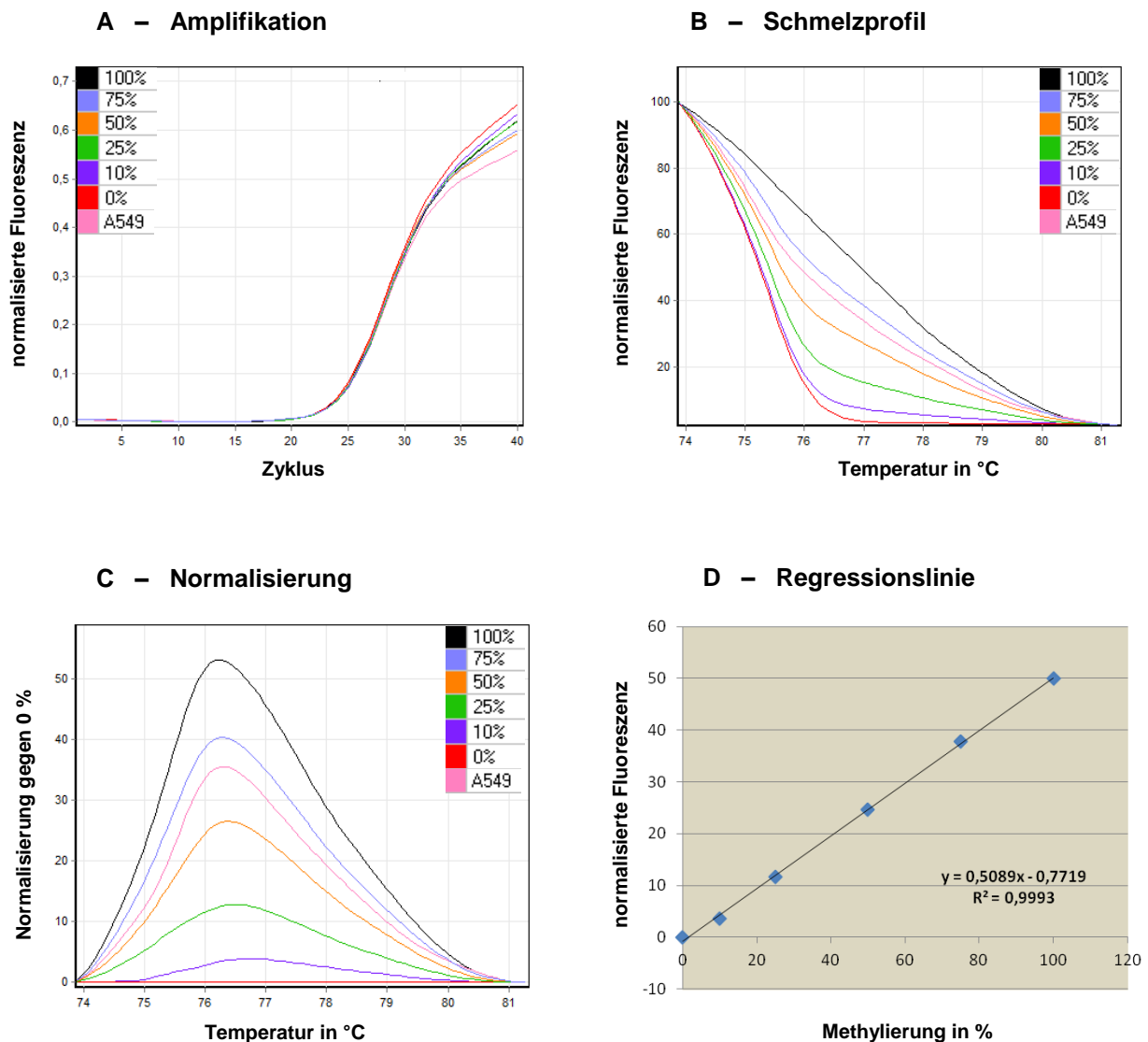


Abbildung 29 MS-HRM-Analyse von *PCDHA12* in NSCLC-Zelllinien. Die Analyse wurde in Duplikaten durchgeführt.

A-C: Die Abbildungen zeigen Amplifikation, Schmelzprofil und Normalisierungsplot der Methylierungsstandards sowie der Zelllinie A549. Dargestellt werden die geometrischen Mittelwerte der Duplikate.

A – Amplifikationsplot: Die Amplifikation der Proben erfolgte bei vergleichbaren Ct-Werten. **B – Schmelzprofil:** Die Schmelztemperatur hängt vom Ausmaß der Methylierung der Probe ab. Das Schmelzprofil zeigt eine gute Auftrennung der Methylierungsstandards nach ihrem Methylierungsgrad (0 - 100 %). **C – Normalisierungsplot:** Die HRM-Daten wurden gegen 0 % methylierte Kontroll-DNA normalisiert. Die Höhe der Peaks (= Fluoreszenz-Höchstwerte) hängt vom Prozentsatz der Methylierung ab. **D – Regressionslinie:** Anhand der Schmelzkurven kann der Prozentsatz der Methylierung nach einer Normalisierung der Daten errechnet werden. Die Peaks der Proben wurden dem Prozentsatz der Methylierung der Standards gegenüber gestellt. Zur Berechnung des Methylierungsprozentsatzes dient die Geradengleichung $y = 0,5089x - 0,7719$. Sie wird umgeformt zu $x = (y + 0,7719) / 0,5089$; y entspricht der Peakhöhe der Probe im Normalisierungsplot. Der Korrelationskoeffizient R^2 repräsentiert (bei einem Idealwert von +1) für jedes Gen den linearen Zusammenhang zwischen den untersuchten Proben. $R^2 = 0,999$ weist auf eine hohe Linearität der Methylierungsstandards für die HRM-Analyse von *PCDHA12* hin.

Starke Methylierung von *PCDHA12* war in allen fünf NSCLC-Zelllinien zu beobachten und reichte von 43,05 % bei der Zelllinie A427 bis zu 89,11 % bei der Zelllinie H1993.

Probe	Fluoreszenz MW	Methylierung in %
A427	21,14	43,05
H1915	40,04	80,19
H1993	44,58	89,11
H2073	35,82	71,90
A549	33,11	66,57

Gen: *SFMBT2*

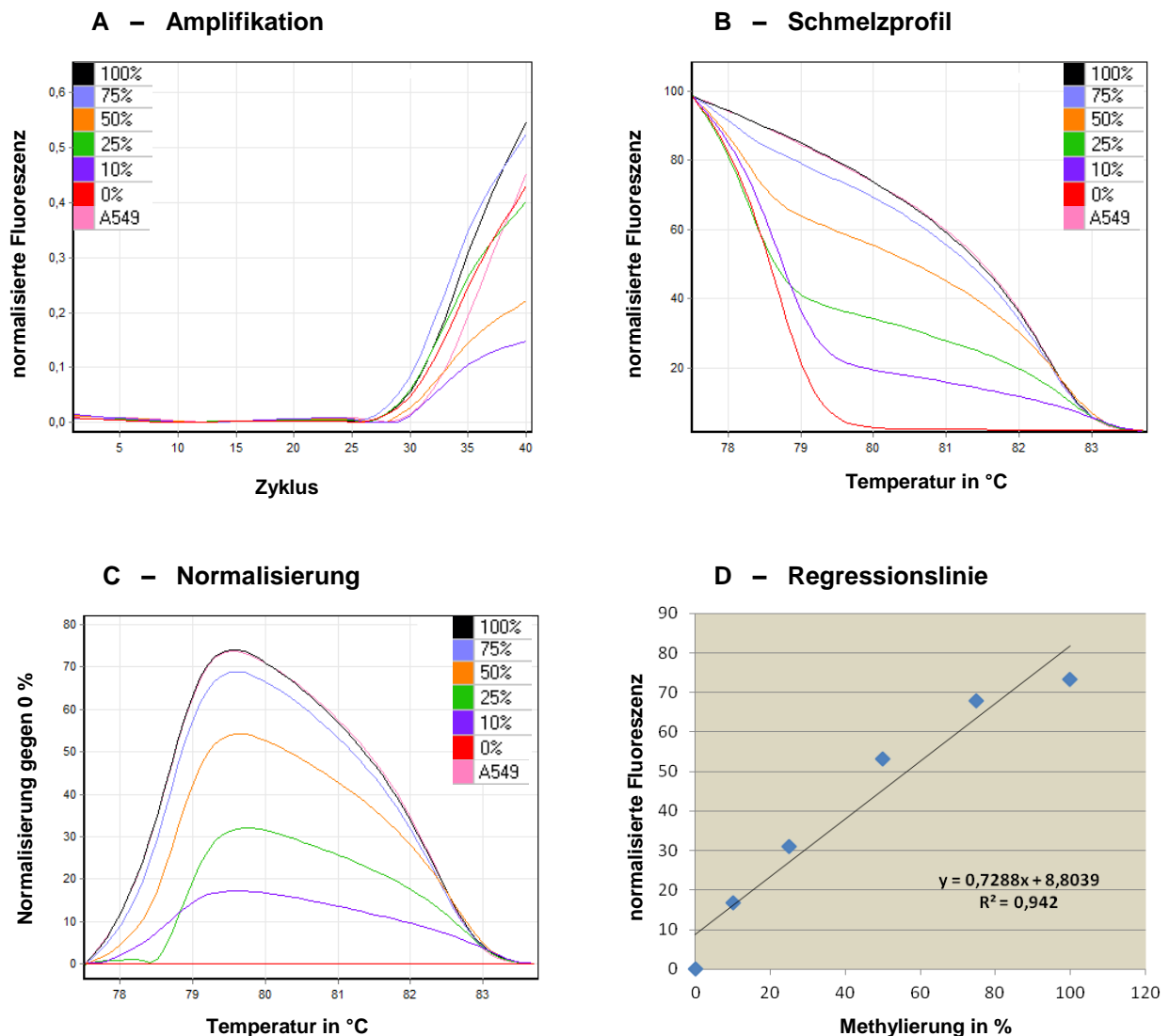


Abbildung 30 MS-HRM-Analyse von *SFMBT2* in NSCLC-Zelllinien. Die Analyse wurde in Duplikaten durchgeführt.

A-C: Die Abbildungen zeigen Amplifikation, Schmelzprofil und Normalisierungsplot der Methylierungsstandards sowie der Zelllinie A549. Dargestellt werden die geometrischen Mittelwerte der Duplikate.

A – Amplifikationsplot: Die Amplifikation der Proben erfolgte bei vergleichbaren Ct-Werten. **B – Schmelzprofil:** Die Schmelztemperatur hängt vom Ausmaß der Methylierung der Probe ab. Das Schmelzprofil zeigt eine gute Auftrennung der Methylierungsstandards nach ihrem Methylierungsgrad (0 - 100 %). **C – Normalisierungsplot:** Die HRM-Daten wurden gegen 0 % methylierte Kontroll-DNA normalisiert. Die Höhe der Peaks (= Fluoreszenz-Höchstwerte) hängt vom Prozentsatz der Methylierung ab. **D – Regressionslinie:** Anhand der Schmelzkurven kann der Prozentsatz der Methylierung nach einer Normalisierung der Daten errechnet werden. Die Peaks der Proben wurden dem Prozentsatz der Methylierung der Standards gegenüber gestellt. Zur Berechnung des Methylierungsprozentsatzes dient die Geradengleichung $y = 0,7288x + 8,8039$. Sie wird umgeformt zu $x = (y - 8,8039) / 0,7288$; y entspricht der Peakhöhe der Probe im Normalisierungsplot. Der Korrelationskoeffizient R^2 repräsentiert (bei einem Idealwert von +1) für jedes Gen den linearen Zusammenhang zwischen den untersuchten Proben. $R^2 = 0,942$ weist auf eine hohe Linearität der Methylierungsstandards für die HRM-Analyse von *SFMBT2* hin.

SFMBT2 weist eine starke Methylierung in den Zelllinien A427, A549 und H1993 auf, während das Gen in den Zelllinien H1915 und H2073 nicht methyliert ist.

Probe	Fluoreszenz MW	Methylierung in %
A427	66,33	78,93
H1915	4,52	-5,87
H1993	62,15	73,19
H2073	0,28	-11,69
A549	72,87	87,90

Zusammenfassend stellen wir fest, dass sich unsere Annahme, in den fünf NSCLC-Zelllinien die Gene *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* methyliert vorzufinden, zum überwiegenden Teil bestätigt hat. Die MS-HRM-Analysen ergaben durchwegs eine Methylierung der Zelllinien zwischen 33 und 100 %. Ausnahmen bilden die beiden Zelllinien H1915 und H2073, bei denen keine Methylierung von *SFMBT2* beobachtet wurde. Weiters konnte eine Analyse des Methylierungsgrades von *IRX2* in den Zelllinien H1993 und H2073 mittels MS-HRM nicht durchgeführt werden.

Die Resultate der HRM-Analysen von NSCLC-Zelllinien lassen zum einen darauf schließen, dass die Methylierung der Gene *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* eine Rolle bei der Pathogenese von NSCLC spielt und belegen gleichzeitig die Eignung der verwendeten Primer für die nachfolgenden Untersuchungen der PatientInnen-DNA.

5.1.3 Ergebnis der MS-HRM-Analyse von DNA-Proben aus Tumor- und korrespondierendem nicht-malignen Lungengewebe von NSCLC-PatientInnen

Nach der erfolgreichen Etablierung der MS-HRM-Assays an NSCLC-Zelllinien und Methylierungskontrollen wurden die Methylierungsanalysen der fünf Gene auf primäres Tumorgewebe und korrespondierendes nicht-malignes Lungengewebe von 97 NSCLC-PatientInnen ausgeweitet (siehe Abb. 31-35). Diese PatientInnenproben wurden in insgesamt 8 MS-HRM-Läufen pro Gen untersucht. Die Amplifikation sämtlicher Proben erfolgte erneut bei vergleichbaren cycle-threshold-Werten (Ct-Werten).

Die mittleren R^2 -Werte der Methylierungsstandards bei diesen Untersuchungen ergaben 0,970 (*EVX1*), 0,991 (*HOXA9*), 0,973 (*IRX2*), 0,999 (*PCDHA12*) bzw. 0,981 (*SFMBT2*). Diese Werte lassen auf eine hohe Linearität und Vergleichbarkeit der Daten schließen. Die Prozentsätze der Methylierungen von Tumor- und assoziiertem nicht-malignen Lungengewebe sind in Abb. 36 grafisch dargestellt. Insgesamt ist ersichtlich, dass der Prozentsatz der Methylierung bei allen untersuchten Genen in den Tumorproben höher ist als in den korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben. Mithilfe des Wilcoxon-Rangsummentests wurde berechnet, dass dieser Unterschied statistisch signifikant ist. Somit konnten wir zeigen, dass alle fünf untersuchten Gene eine hochsignifikante tumorspezifische Methylierung aufweisen. Diese Daten bestätigen eindrucksvoll die Ergebnisse der vorangehenden MeDIP-Chip-Analysen.

In einem nächsten Schritt wurde der Methylierungsstatus eines Gens durch das Verhältnis T/N (Prozent der Methylierung im Tumorgewebe / Prozent der Methylierung im Normalgewebe) bestimmt. Eine T/N-Ratio $\geq 1,5$ wurde für das Vorhandensein einer Methylierung im untersuchten Gen der jeweiligen PatientInnenprobe festgelegt; eine T/N-Ratio $< 1,5$ bedeutet, dass es sich um eine Probe ohne signifikante Genmethylierung handelt. Folgende tumorspezifische Methylierungsgrade wurden in den PatientInnenproben detektiert: *EVX1* (68%), *PCDHA12* (62%), *IRX2* (56%), *SFMBT2* (45%), *HOXA9* (40%). Die T/N-Ratios wurden weiters herangezogen, um einen Vergleich des Methylierungsstatus der fünf beschriebenen Gene mit klinisch-pathologischen Charakteristika der NSCLC-PatientInnen vorzunehmen (siehe 5.3).

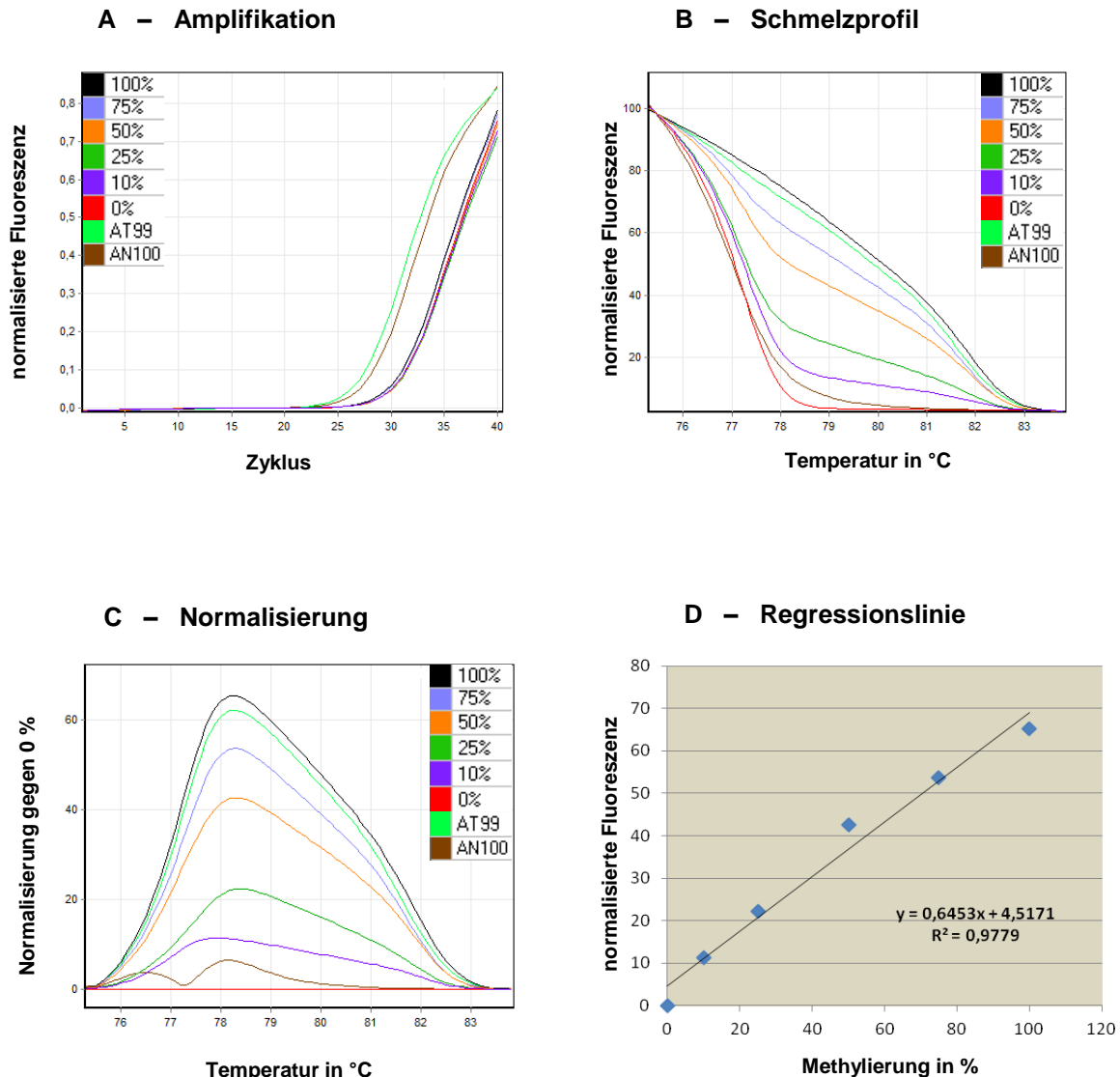


Abbildung 31 MS-HRM-Analyse von *EVX1* in Tumor- und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von NSCLC-PatientInnen. Die Analyse wurde in Duplikaten durchgeführt.

A-C: Die Abbildungen zeigen Amplifikation, Schmelzprofil und Normalisierungsplot der Methylierungsstandards sowie der DNA aus Tumorprobe AT99 und aus der nicht-malignen Lungengewebsprobe AN100 im Vergleich. Dargestellt werden die geometrischen Mittelwerte der Duplikate.

A – Amplifikationsplot: Die Amplifikation der Proben erfolgte bei vergleichbaren Ct-Werten.

B – Schmelzprofil: Die Schmelztemperatur hängt vom Ausmaß der Methylierung der Probe ab. Das Schmelzprofil zeigt eine gute Auftrennung der Methylierungsstandards nach ihrem Methylierungsgrad (0 - 100 %).

C – Normalisierungsplot: Die HRM-Daten wurden gegen 0 % methylierte Kontroll-DNA normalisiert. Die Höhe der Peaks (= Fluoreszenz-Höchstwerte) hängt vom Prozentsatz der Methylierung ab.

D – Regressionslinie: Anhand der Schmelzkurven kann der Prozentsatz der Methylierung nach einer Normalisierung der Daten errechnet werden. Die Peaks der Proben wurden dem Prozentsatz der Methylierung der Standards gegenüber gestellt. Zur Berechnung des Methylierungsprozentsatzes dient die Geradengleichung $y = 0,6453x + 4,5171$. Sie wird umgeformt zu $x = (y - 4,5171) / 0,6453$; y entspricht der Peakhöhe der Probe im Normalisierungsplot. Der Korrelationskoeffizient R^2 repräsentiert (bei einem Idealwert von +1) für jedes Gen den linearen Zusammenhang zwischen den untersuchten Proben. $R^2 = 0,977$ weist auf eine hohe Linearität der Methylierungsstandards für die HRM-Analyse von *EVX1* hin.

Mittels dieses HRM-Durchlaufes konnte die Methylierung der Probe AT99 mit 89 %, die Methylierung der Probe AN100 mit 2,8 % bestimmt werden (nicht angezeigt).

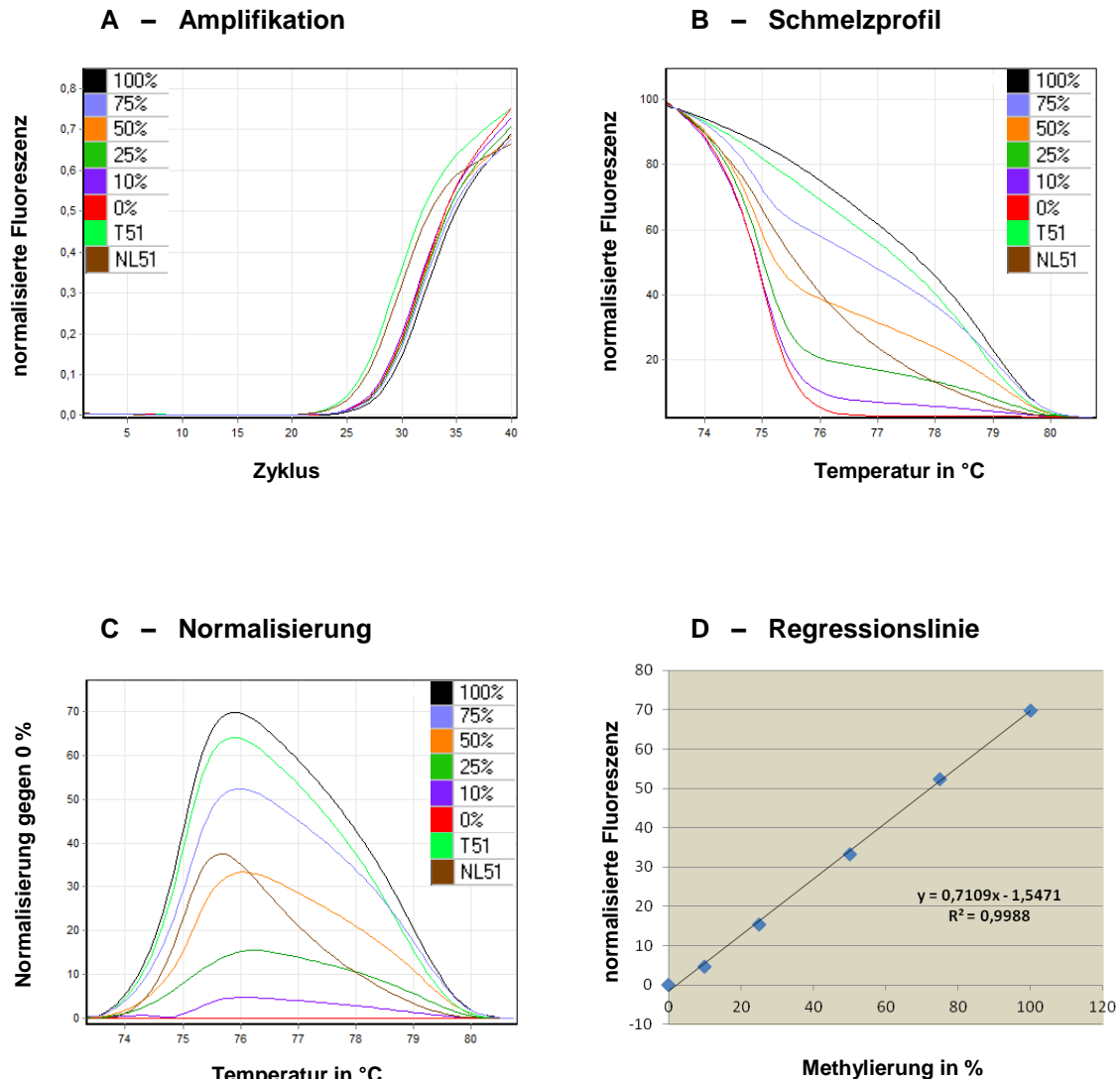


Abbildung 32 MS-HRM-Analyse von *HOXA9* in Tumor- und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von NSCLC-PatientInnen. Die Analyse wurde in Duplikaten durchgeführt.

A-C: Die Abbildungen zeigen Amplifikation, Schmelzprofil und Normalisierungsplot der Methylierungsstandards sowie der DNA aus Tumorprobe T51 und aus der nicht-malignen Lungengewebsprobe NL51 im Vergleich. Dargestellt werden die geometrischen Mittelwerte der Duplikate.

A – Amplifikationsplot: Die Amplifikation der Proben erfolgte bei vergleichbaren Ct-Werten.

B – Schmelzprofil: Die Schmelztemperatur hängt vom Ausmaß der Methylierung der Probe ab. Das Schmelzprofil zeigt eine gute Auftrennung der Methylierungsstandards nach ihrem Methylierungsgrad (0 - 100 %).

C – Normalisierungsplot: Die HRM-Daten wurden gegen 0 % methylierte Kontroll-DNA normalisiert. Die Höhe der Peaks (= Fluoreszenz-Höchstwerte) hängt vom Prozentsatz der Methylierung ab.

D – Regressionslinie: Anhand der Schmelzkurven kann der Prozentsatz der Methylierung nach einer Normalisierung der Daten errechnet werden. Die Peaks der Proben wurden dem Prozentsatz der Methylierung der Standards gegenüber gestellt. Zur Berechnung des Methylierungsprozentsatzes dient die Geradengleichung $y = 0,7109x - 1,547$. Sie wird umgeformt zu $x = (y+1,5471)/0,7109$; y entspricht der Peakhöhe der Probe im Normalisierungsplot. Der Korrelationskoeffizient R^2 repräsentiert (bei einem Idealwert von +1) für jedes Gen den linearen Zusammenhang zwischen den untersuchten Proben. $R^2 = 0,998$ weist auf eine hohe Linearität der Methylierungsstandards für die HRM-Analyse von *HOXA9* hin.

Mittels dieses HRM-Durchlaufes konnte die Methylierung der Proben T51 (92,1 %) und NL51 (54,74 %) sowie weiterer 28 Proben aus PatientInnen-DNA bestimmt werden (nicht angezeigt).

Gen: *IRX2*

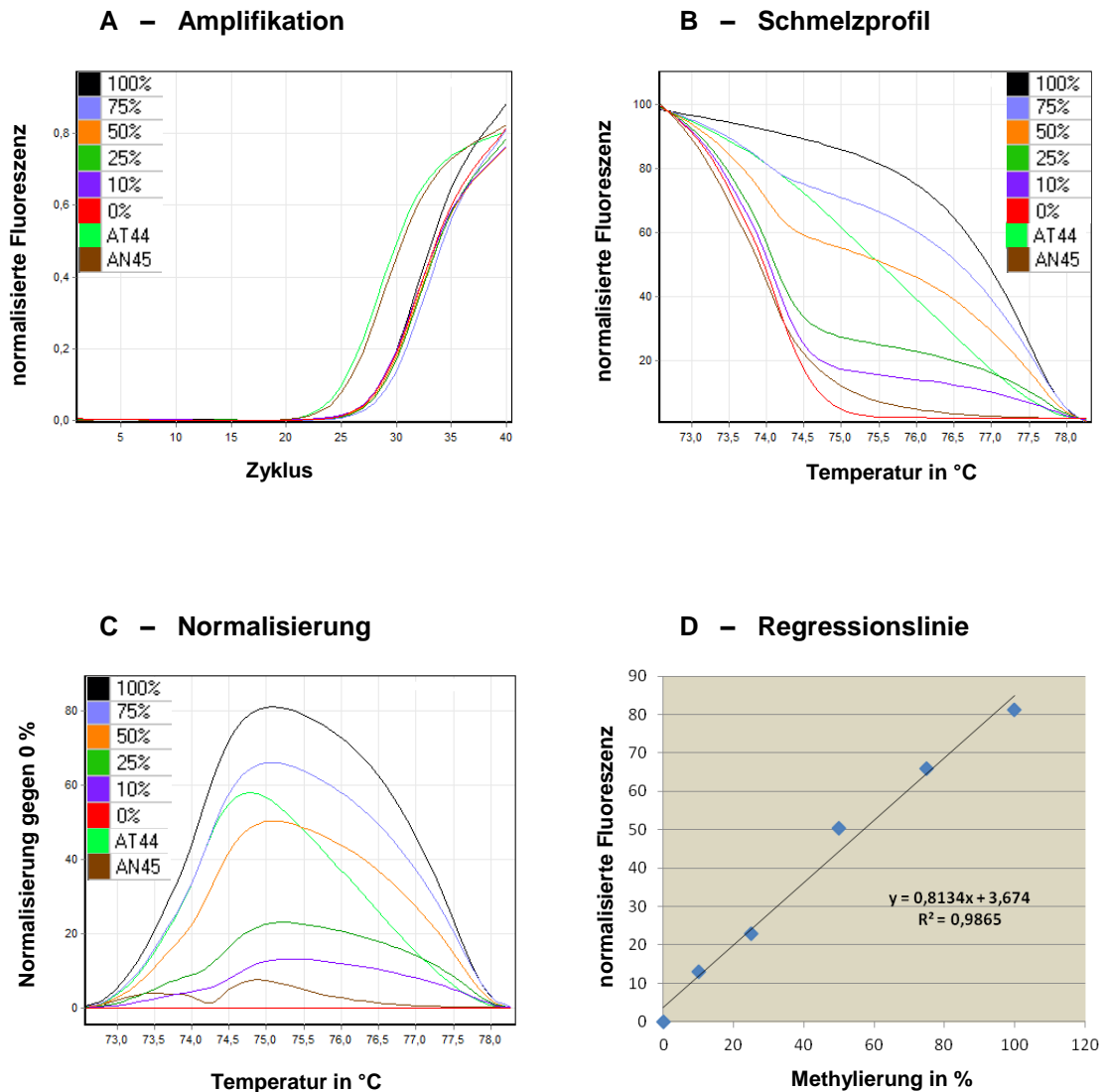


Abbildung 33 MS-HRM-Analyse von *IRX2* in Tumor- und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von NSCLC-PatientInnen. Die Analyse wurde in Duplikaten durchgeführt.

A-C: Die Abbildungen zeigen Amplifikation, Schmelzprofil und Normalisierungsplot der Methylierungsstandards sowie der DNA aus Tumorprobe AT44 und aus der nicht-malignen Lungengewebsprobe AN45 im Vergleich. Dargestellt werden die geometrischen Mittelwerte der Duplikate.

A – Amplifikationsplot: Die Amplifikation der Proben erfolgte bei vergleichbaren Ct-Werten.

B – Schmelzprofil: Die Schmelztemperatur hängt vom Ausmaß der Methylierung der Probe ab. Das Schmelzprofil zeigt eine gute Auftrennung der Methylierungsstandards nach ihrem Methylierungsgrad (0 - 100 %).

C – Normalisierungsplot: Die HRM-Daten wurden gegen 0 % methylierte Kontroll-DNA normalisiert. Die Höhe der Peaks (= Fluoreszenz-Höchstwerte) hängt vom Prozentsatz der Methylierung ab.

D – Regressionslinie: Anhand der Schmelzkurven kann der Prozentsatz der Methylierung nach einer Normalisierung der Daten errechnet werden. Die Peaks der Proben wurden dem Prozentsatz der Methylierung der Standards gegenüber gestellt. Zur Berechnung des Methylierungsprozentsatzes dient die Geradengleichung $y = 0,8134x + 3,674$. Sie wird umgeformt zu $x = (y-3,674)/0,8134$; y entspricht der Peakhöhe der Probe im Normalisierungsplot. Der Korrelationskoeffizient R^2 repräsentiert (bei einem Idealwert von +1) für jedes Gen den linearen Zusammenhang zwischen den untersuchten Proben. $R^2 = 0,986$ weist auf eine hohe Linearität der Methylierungsstandards für die HRM-Analyse von *IRX2* hin.

Mittels dieses HRM-Durchlaufes konnte die Methylierung der Proben AT44 (66,87 %) und AN45 (4,58 %) sowie weiterer 28 Proben aus PatientInnen-DNA bestimmt werden (nicht angezeigt).

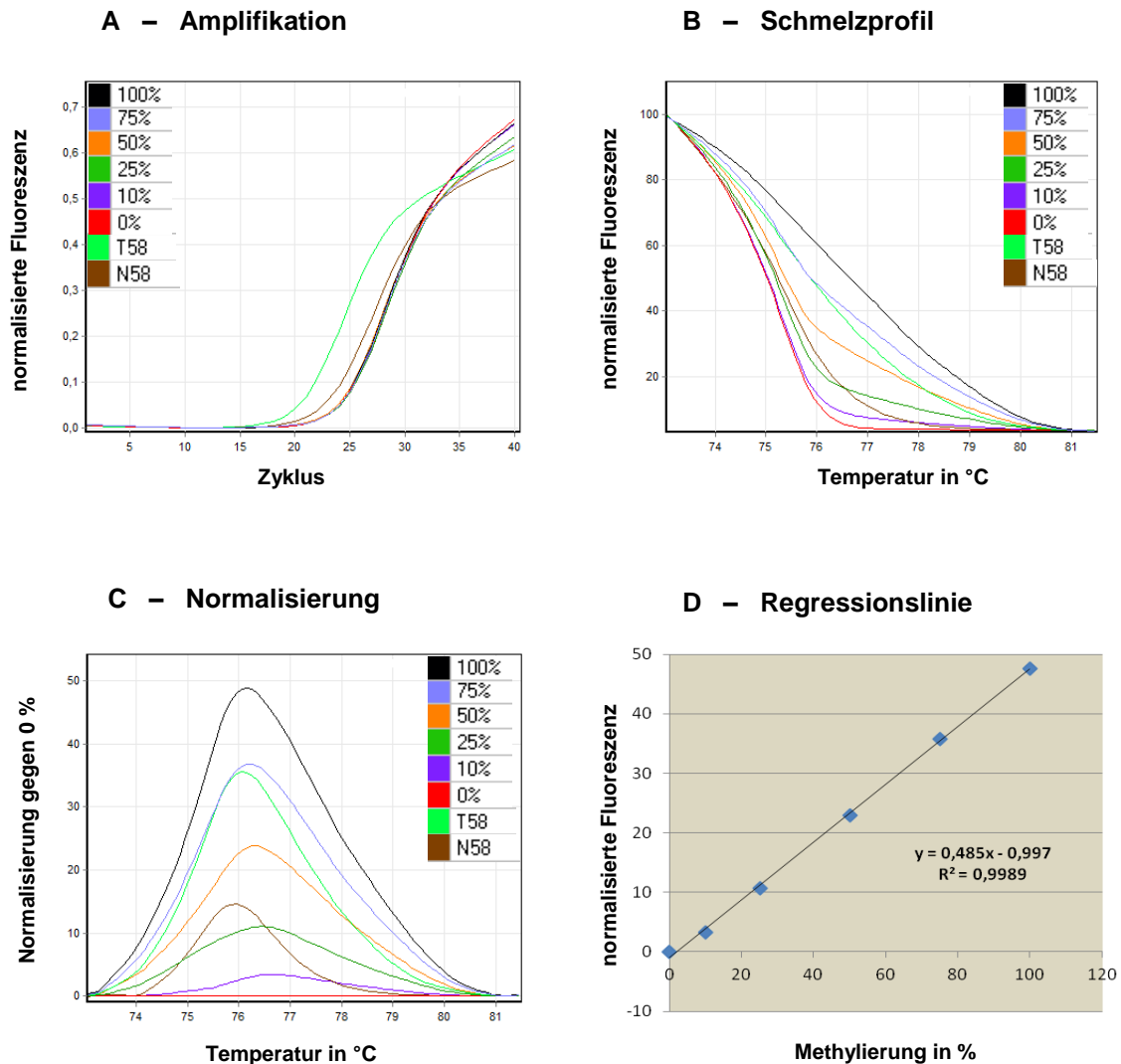


Abbildung 34 MS-HRM-Analyse von *PCDHA12* in Tumor- und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von NSCLC-PatientInnen. Die Analyse wurde in Duplikaten durchgeführt.

A-C: Die Abbildungen zeigen Amplifikation, Schmelzprofil und Normalisierungsplot der Methylierungsstandards sowie der DNA aus Tumorprobe T58 und aus der nicht-malignen Lungengewebsprobe N58 im Vergleich. Dargestellt werden die geometrischen Mittelwerte der Duplikate.

A – Amplifikationsplot: Die Amplifikation der Proben erfolgte bei vergleichbaren Ct-Werten.
B – Schmelzprofil: Die Schmelztemperatur hängt vom Ausmaß der Methylierung der Probe ab. Das Schmelzprofil zeigt eine gute Auftrennung der Methylierungsstandards nach ihrem Methylierungsgrad (0 - 100 %).
C – Normalisierungsplot: Die HRM-Daten wurden gegen 0 % methylierte Kontroll-DNA normalisiert. Die Höhe der Peaks (= Fluoreszenz-Höchstwerte) hängt vom Prozentsatz der Methylierung ab.
D – Regressionslinie: Anhand der Schmelzkurven kann der Prozentsatz der Methylierung nach einer Normalisierung der Daten errechnet werden. Die Peaks der Proben wurden dem Prozentsatz der Methylierung der Standards gegenüber gestellt. Zur Berechnung des Methylierungsprozentsatzes dient die Geradengleichung $y = 0,485x - 0,997$. Sie wird umgeformt zu $x = (y + 0,997) / 0,485$; y entspricht der Peakhöhe der Probe im Normalisierungsplot. Der Korrelationskoeffizient R^2 repräsentiert (bei einem Idealwert von +1) für jedes Gen den linearen Zusammenhang zwischen den untersuchten Proben. $R^2 = 0,998$ weist auf eine hohe Linearität der Methylierungsstandards für die HRM-Analyse von *PCDHA12* hin.

Mittels dieses HRM-Durchlaufes konnte die Methylierung der Proben T58 (72,98 %) und N58 (30,9 %) sowie weiterer 28 Proben aus PatientInnen-DNA bestimmt werden (nicht angezeigt).

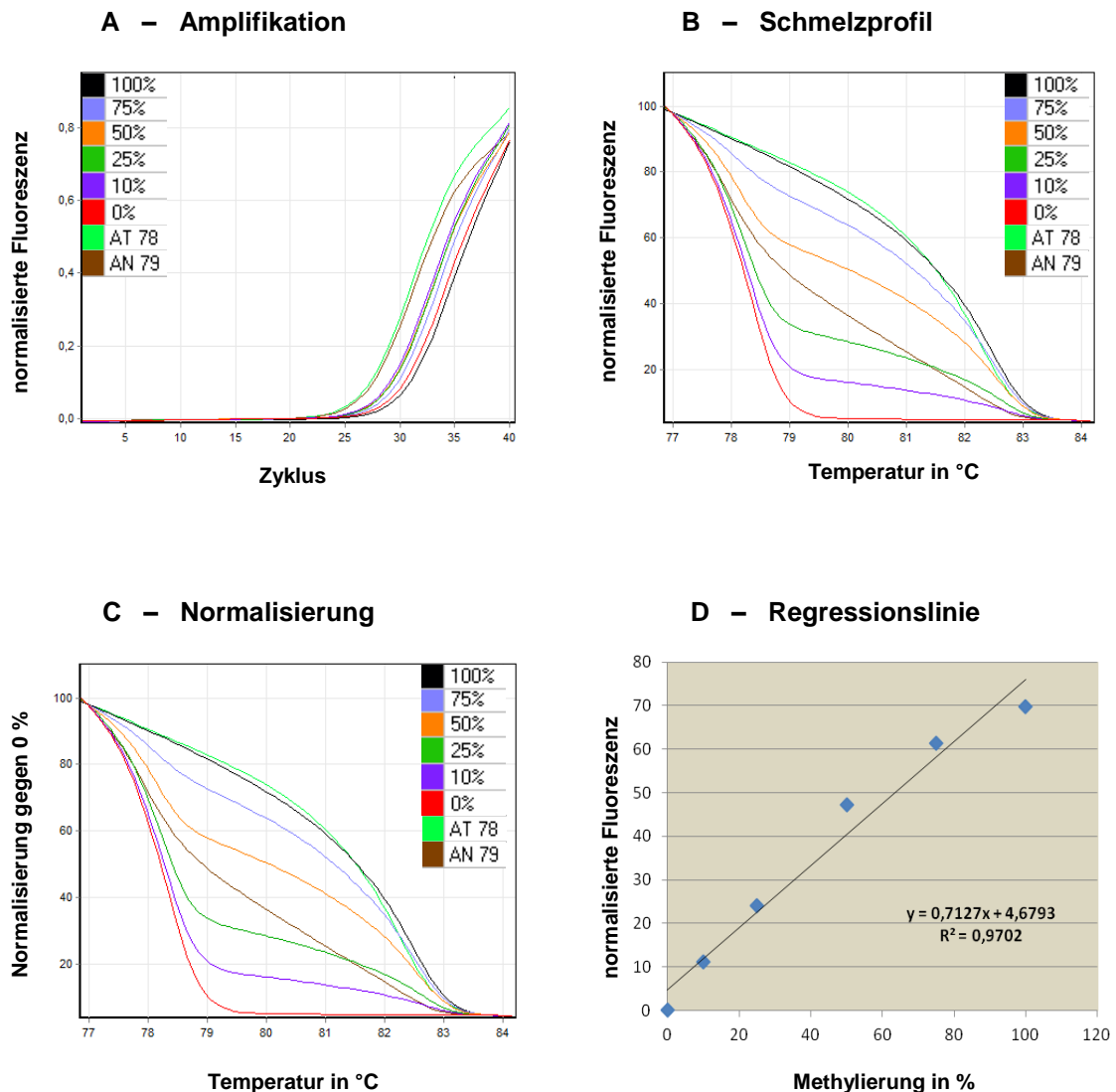


Abbildung 35 MS-HRM-Analyse von *SFMBT2* in Tumor- und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von NSCLC-PatientInnen. Die Analyse wurde in Duplikaten durchgeführt.

A-C: Die Abbildungen zeigen Amplifikation, Schmelzprofil und Normalisierungsplot der Methylierungsstandards sowie der DNA aus Tumorprobe AT78 und aus der nicht-malignen Lungengewebsprobe AN79 im Vergleich. Dargestellt werden die geometrischen Mittelwerte der Duplikate.

A – Amplifikationsplot: Die Amplifikation der Proben erfolgte bei vergleichbaren Ct-Werten.

B – Schmelzprofil: Die Schmelztemperatur hängt vom Ausmaß der Methylierung der Probe ab. Das Schmelzprofil zeigt eine gute Auftrennung der Methylierungsstandards nach ihrem Methylierungsgrad (0 - 100 %).

C – Normalisierungsplot: Die HRM-Daten wurden gegen 0 % methylierte Kontroll-DNA normalisiert. Die Höhe der Peaks (= Fluoreszenz-Höchstwerte) hängt vom Prozentsatz der Methylierung ab.

D – Regressionslinie: Anhand der Schmelzkurven kann der Prozentsatz der Methylierung nach einer Normalisierung der Daten errechnet werden. Die Peaks der Proben wurden dem Prozentsatz der Methylierung der Standards gegenüber gestellt. Zur Berechnung des Methylierungsprozentsatzes dient die Geradengleichung $y = 0,7127x + 4,6793$. Sie wird umgeformt zu $x = (y - 4,6793) / 0,7127$; y entspricht der Peakhöhe der Probe im Normalisierungsplot. Der Korrelationskoeffizient R^2 repräsentiert (bei einem Idealwert von +1) für jedes Gen den linearen Zusammenhang zwischen den untersuchten Proben. $R^2 = 0,970$ weist auf eine hohe Linearität der Methylierungsstandards für die HRM-Analyse von *SFMBT2* hin.

Mittels dieses HRM-Durchlaufes konnte die Methylierung der Proben AT78 (93,58 %) und AN79 (45,27 %) sowie weiterer 28 Proben aus PatientInnen-DNA bestimmt werden (nicht angezeigt).

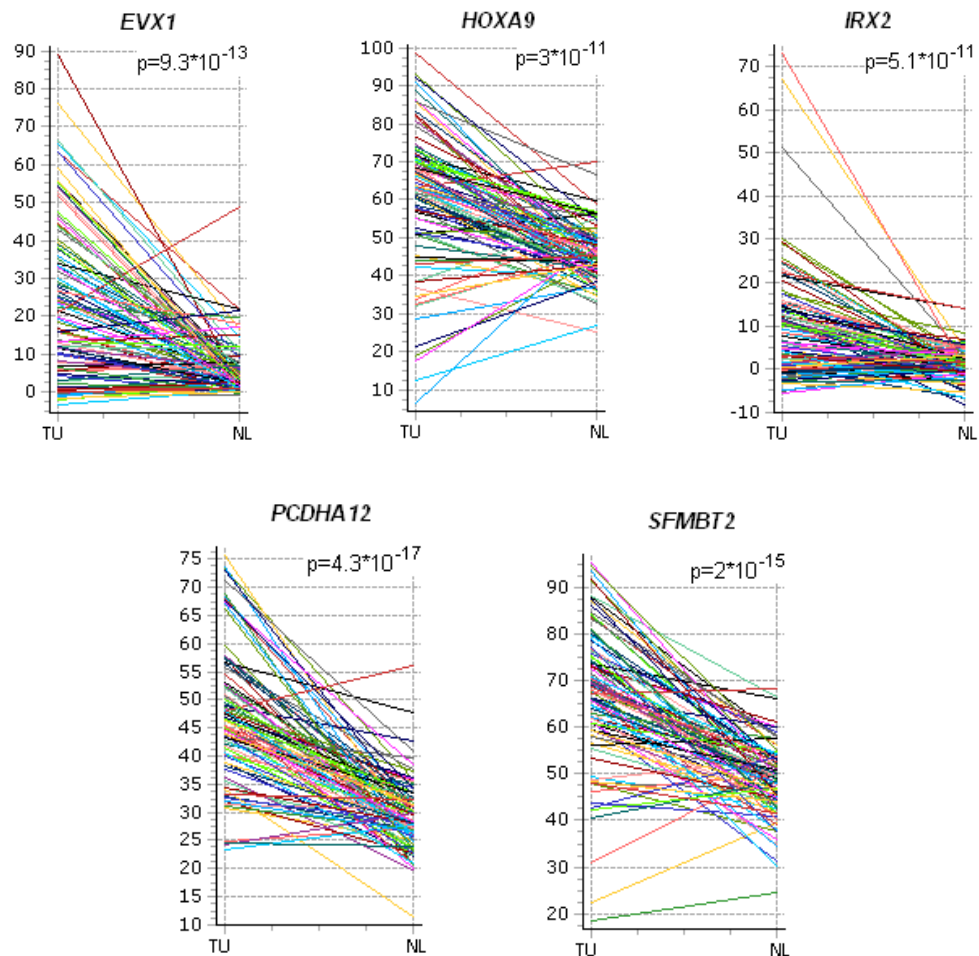


Abbildung 36 MS-HRM-Analyse von fünf Genen in primärem Tumor- und korrespondierendem nicht-malignen Lungengewebe von 97 NSCLC-PatientInnen. Mittels MS-HRM-Analysen wurden die Methylierungsgrade der Gene *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* in Primärtumoren (TU) und den korrespondierenden nicht-malignen Lungengeweben (NL) miteinander verglichen. Die Untersuchung ergab eine signifikante tumorspezifische Methylierung der Gene in Primärtumoren. Die Linien in den Diagrammen repräsentieren die Prozent der Methylierung.

5.2 Ergebnis der genomischen Bisulfitssequenzierung (BGS)

Zur Validierung einiger durch MS-HRM erhaltenen Daten führten wir zusätzlich die genomische Bisulfitssequenzierung eines Teils der 5'-Regionen von *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* in ausgewählten Tumor- und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben durch. Die untersuchte Gensequenz beinhaltet auch jene Region, die mittels MS-HRM analysiert wurde. Für den Vergleich der Methylierungsprozent zwischen Tumor- und Normalgewebe wurden pro Gen je drei Klone der Primärtumorproben und assoziierten nicht-malignen Lungengewebsproben zur Sequenzierung eingesandt und 13-17 CpGs pro Gen analysiert (siehe Abb. 37).

Die Untersuchung ergab, dass ein Großteil der CpG-Dinukleotide in Tumorproben methyliert sind (73 - 100 %), während im Normalgewebe kaum Methylierungen an diesen CpGs vorzufinden waren (0 - 1 %). Diese Daten bestätigen eindeutig die Resultate der MS-HRM-Analysen.

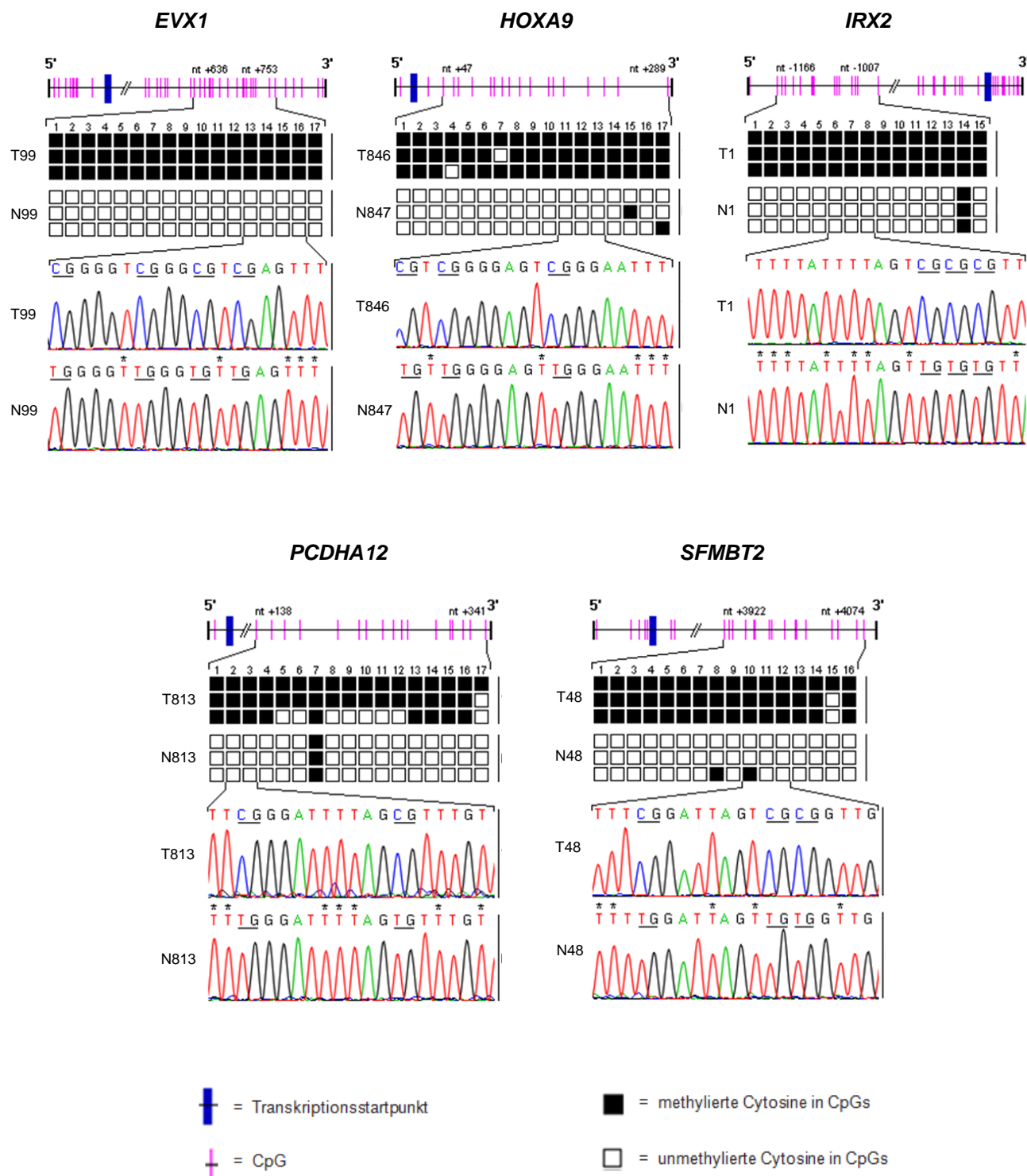


Abbildung 37 Ergebnisse der genomischen Bisulfitsequenzierung. Die tumorspezifische Methylierung der 5'-Regionen der Gene *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* konnte anhand der BGS-Analysen bestätigt werden. Pro Tumor- und korrespondierender nicht-maligner Lungengewebsprobe wurden je drei Klone zur Sequenzierung eingesandt. Pro Gen wurden je 13-17 CpGs in primärem Tumor- und korrespondierendem nicht-malignen Lungengewebe auf Methylierung untersucht. Das Chromatogramm repräsentiert einen Auszug der BGS der Gene im Primärtumor wie auch im korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebe. Die CpGs sind unterstrichen, der Stern kennzeichnet Cytosine außerhalb von CpGs, die im Anschluss an die Natrium-Bisulfid-Behandlung in Thyminen konvertiert wurden.

5.3 Vergleich der Methylierungsdaten von NSCLC-PatientInnen mit deren klinisch-pathologischen Charakteristika

Um die Methylierungsstatus der fünf beschriebenen Gene mit klinisch-pathologischen Charakteristika der NSCLC-PatientInnen vergleichen zu können, wurden die T/N-Ratios herangezogen. Für die Bewertung der Unterschiede zwischen den Gruppen wurden χ^2 -Tests und der exakte Test nach Fisher angewandt. Um die Unterschiede zwischen den Mittelwerten zu bestimmen, wurden T-Tests verwendet. Das Cox-Modell (proportionales Hazard-Modell) fand Anwendung bei multivariaten Analysen zum DFS und Gesamtüberleben. Dabei berücksichtigt wurden die Faktoren Geschlecht, Alter, Tumorstadium, Lymphknotenstadium und Krankheitsstadium.

Wir konnten beobachten, dass die Methylierungen der Gene *EVX1* und *SFMBT2* mit einem höheren Lebensalter zum Zeitpunkt der Erkrankung korrelieren (T-Test für die Mittelwertgleichheit, $p=0,042$ bzw. $p=0,035$). Weiters wurde eine Methylierung von *SFMBT2* häufiger bei PatientInnen mit Plattenepithelkarzinomen (SCC) als bei PatientInnen mit Adenokarzinomen (ADC) gefunden (exakter Test nach Fisher: $p=0,012$). Der Kaplan-Meier-Test ergab, dass PatientInnen mit SCC, bei denen *HOXA9* methyliert war, ein signifikant kürzeres DFS als SCC-PatientInnen ohne *HOXA9*-Methylierung hatten (mittleres Überleben: 35 Monate vs. nicht erreicht, $p = 0,0046$, siehe Abb. 38). Für das Gesamtüberleben wurde diesbezüglich kein statistisch signifikanter Zusammenhang beobachtet.

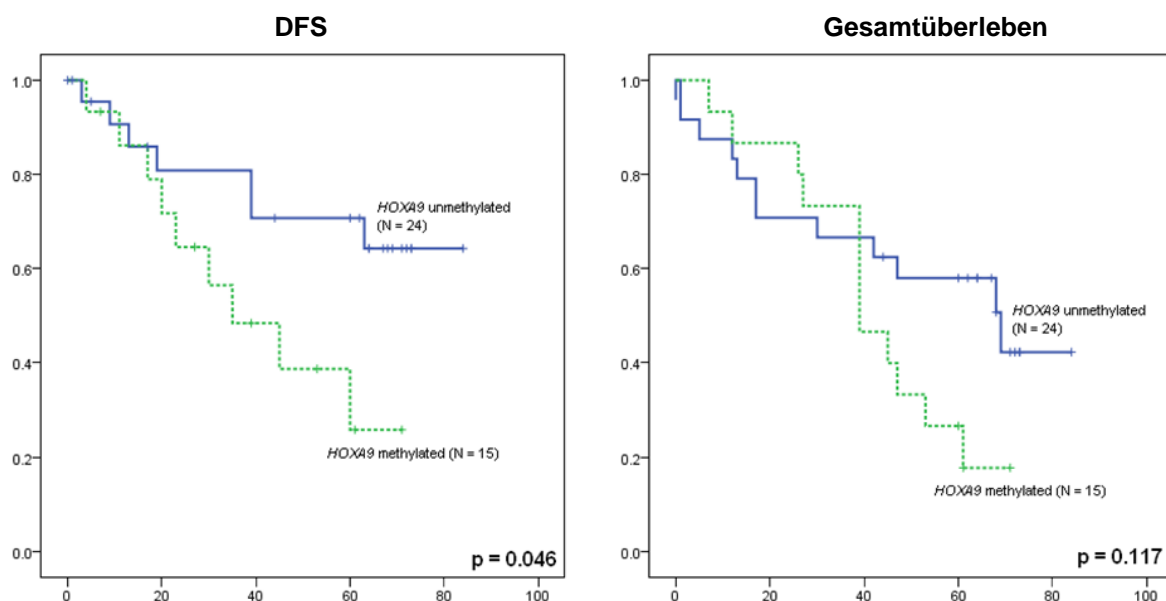


Abbildung 38 DFS und Gesamtüberleben von PatientInnen mit und ohne *HOXA9*-Methylierung. Der univariate Kaplan-Meier-Test ergab, dass die Methylierung von *HOXA9* einen signifikanten negativen Einfluss auf das DFS von 39 SCC-PatientInnen hat ($p=0,046$). Ein Zusammenhang zwischen *HOXA9*-Methylierung und der Gesamtüberlebensdauer der PatientInnen dürfte ebenfalls bestehen, hier liegt allerdings keine statistische Signifikanz vor ($p=0,117$).

Eine multivariate Analyse zeigte, dass die Methylierung von *HOXA9* ein unabhängiger prognostischer Faktor für kürzeres DFS von SCC PatientInnen ist (HR = 4,6, 95 % CI = 1,3 bis 16,1, $p=0,018$).

5.4 Ergebnisse der Western Blots

Die im Zuge der MS-HRM-Analysen ermittelte Methylierung von *SFMBT2* in den NSCLC-Zelllinien A427, A549, NCI-H1915, NCI-H1993 und NCI-H2073 (siehe 5.1.2) nahmen wir zum Anlass, die Expression des Gens in diesen Zellen mit der Expression in nicht-malignem Lungengewebe zu vergleichen. Weiters erfolgte der Vergleich der Expressionsmuster der unbehandelten und der mit Aza-dC und/oder TSA behandelten Zellen der Zelllinie A549.

Zunächst wurde das aus verschiedenen nicht-malignen Lungengewebsproben isolierte Proteingemisch von NSCLC-PatientInnen auf die Expression von *SFMBT2* überprüft. Laut Hersteller des Antikörpers war ein mögliches atomares Molekulargewicht von ca. 100 kDa zu erwarten, abweichende Ergebnisse wären jedoch nicht auszuschließen.

Wir fanden neben sehr schwachen, unspezifischen Banden drei eindeutige Banden im Bereich von 50 kDa, was auf eine Fixierung des Proteins auf der Membran in diesem Bereich schließen lässt (siehe Abb. 39). Anhand der zuvor mittels MS-HRM erhobenen Daten deckt sich dieses Resultat mit unserer Annahme, in normalem Lungengewebe (nahezu) keine Methylierung und somit Proteinexpression von *SFMBT2* zu detektieren.

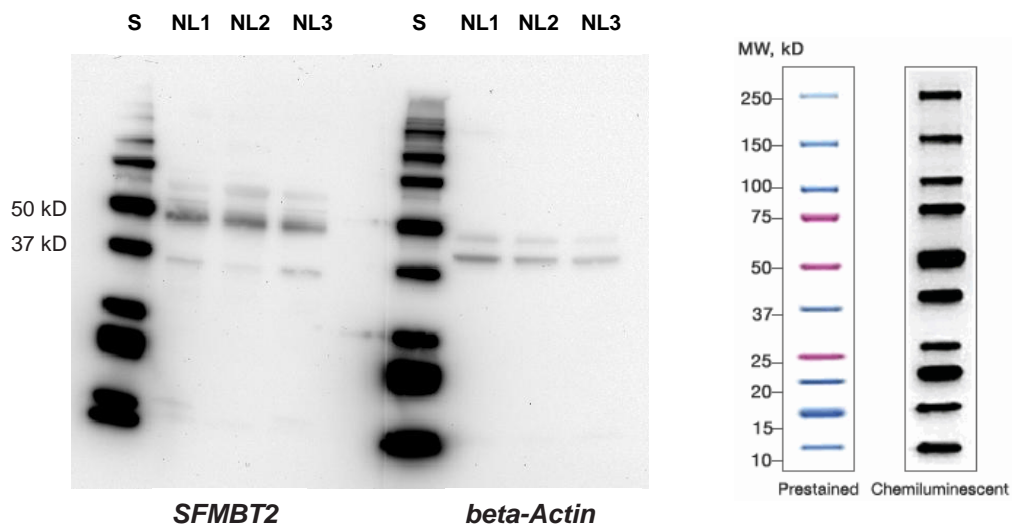


Abbildung 39 Western Blot zur Detektion der *SFMBT2*-Expression in nicht-malignen Lungengewebe von NSCLC-PatientInnen. Abbildung links: Das Ergebnis des Western Blots für *SFMBT2* zeigt nach Umsetzung des Luminols im Geldokumentationsgerät drei Banden bei ca. 50 kD. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um das fixierte Protein *SFMBT2* handelt. Als Kontroll-Blot ist *beta-Actin* bei 42 kD zu erkennen. Das Bild zeigt das Ergebnis nach einer chemischen Reaktionsdauer von 20 min. **S** = 250 kD Proteinstandard, **NL1-3** = nicht-malignes Lungengewebe Probe 1 bis 3
Abbildung rechts: Proteinstandard zum Vergleich

Im zweiten Blot-Durchgang wurde die Expression von *SFMBT2* in nicht-malignen Lungengeweben der Expression des Proteins in NSCLC-Zelllinien gegenüber gestellt (siehe Abb. 40).

Die eindeutige Bandenbildung bei den Proteinen aus nicht-malignen, unmethylierten Lungengewebsproben weist auf eine Expression des Proteins *SFMBT2* hin, die in den methylierten Zelllinien A427, A549 und H1993 nicht zu finden ist. Dies deutet zum einen auf die Inaktivierung des Gens *SFMBT2* durch Methylierung hin, wodurch keine Proteinexpression stattfindet. Zum anderen wäre eine Expression von *SFMBT2* demnach auch in den Zelllinien H1915 und H2073 zu erwarten, da es sich hierbei gemäß unserer HRM-Daten um Zelllinien ohne Methylierung von *SFMBT2* handelt. Neben der Methylierung als Mechanismus zur Geninaktivierung können allerdings andere in NSCLC-Zelllinien wirkende Mechanismen mit inhibierendem Effekt auf die Genexpression nicht ausgeschlossen werden.

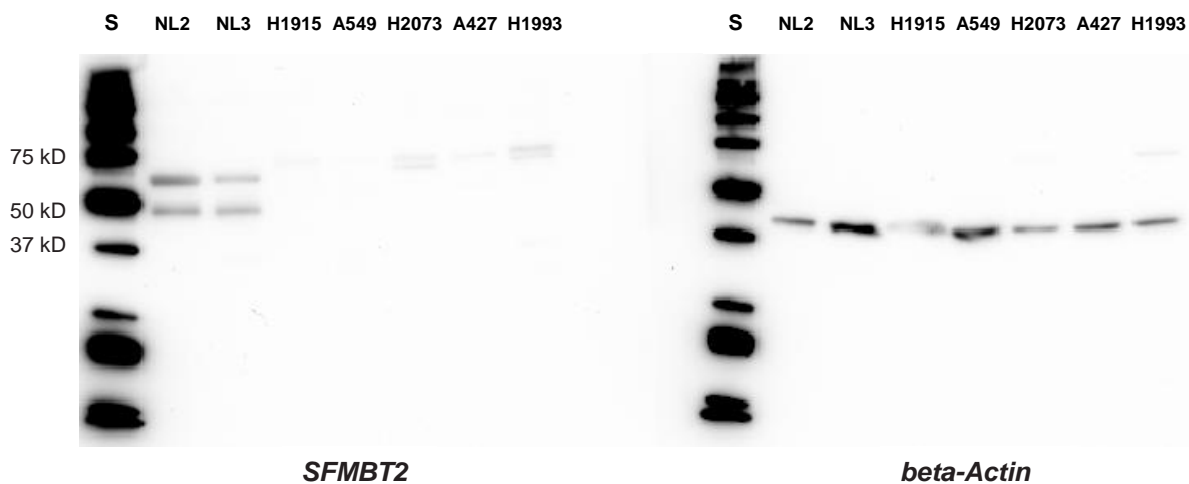


Abbildung 40 Western Blot zur Detektion der *SFMBT2*-Expression in nicht-malignen Lungengeweben und NSCLC-Zelllinien. Der *SFMBT2*-Antikörper liefert bei beiden Normalgeweben Banden zwischen 47 und 65 kD. Bei den Zellen der NSCLC-Zelllinien sind derartige Banden nicht zu erkennen. Da es sich hierbei gemäß unserer HRM-Analysen um methylierte Zelllinien handelt, war eine Inaktivierung des Gens zu erwarten und mit einer Expression des Proteins nicht zu rechnen. Ausnahme bilden die Zelllinien 1995 und H2073, welche keine Methylierung von *SFMBT2* aufweisen. Hier wurden Banden erwartet, die auf eine Expression des Proteins schließen lassen. Vermutlich kommt in diesen beiden Zelllinien ein anderer, für die Inhibierung der Genexpression wesentlicher Faktor zum Tragen. Als Kontroll-Blot ist *beta-Actin* bei 42 kD in allen Proben zu erkennen. Das Bild zeigt das Ergebnis nach einer chemischen Reaktionsdauer von 30 min. S = 250 kD Proteinstandard, NL2-3 = nicht-malignes Lungengewebe Probe 2 bis 3, NSCLC-Zelllinien: A427, A549, NCI-H1915, NCI-H1993 und NCI-H2073

Die dritte Western-Blot-Untersuchung widmete sich der Gegenüberstellung der Expression von *SFMBT2* in nicht-malignem Lungengewebe mit der *SFMBT2*-Expression in der unbehandelten bzw. mit Aza-dC und/oder TSA behandelten Zellen der Zelllinie A549 (siehe auch 4.1.2).

Erneut konnte eine Bestätigung der Expression von *SFMBT2* in unmethyliertem, nicht-malignen Lungengewebe durch Anwesenheit von Banden im Bereich von 47 bis 65 kD erzielt werden (siehe Abb. 41). Weiters ist zu beachten, dass eine Behandlung von Krebszelllinien mit dem demethylierenden Agens Aza-dC und/oder dem Histondeacetylase-Inhibitor TSA positiven Einfluss auf die Expression herabregulierter Gene hat. Die A549-Zelllinie zeigte nach Behandlung mit Aza-dC eine leicht erhöhte Proteinexpression von *SFMBT2*. Bei kombiniertem Einsatz von Aza-dC mit TSA war außerdem ein stärkerer Effekt bei der Aufhebung der Gen-Inaktivierung durch Methylierung zu sehen als bei alleiniger Behandlung der Zelllinie mit Aza-dC.

Das Ergebnis der Analyse zeigt auf, dass die Behandlung von Lungenkrebszellen mit epigenetisch aktiven Agenzien eine Reaktivierung von methyliertem *SFMBT2* erwirken kann.

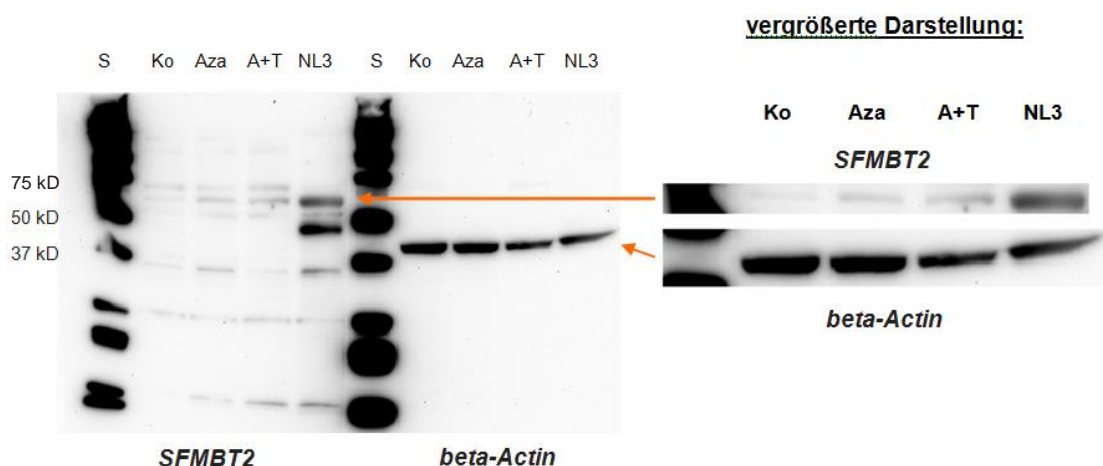


Abbildung 41 Western Blot zur Detektion der *SFMBT2*-Expression in nicht-malignem Lungengewebe und unbehandelter bzw. mit demethylierenden und/oder histondeacetylierenden Agenzien behandelter Zelllinie A549. Im unmethylierten Normalgewebe wird *SFMBT2* exprimiert. In den Zellen der unbehandelten A549-Zelllinie hingegen findet Gen-Silencing durch Methylierung statt; es konnte keine Bande detektiert werden. Je nach Ausmaß der Behandlung der Zelllinien mit epigenetisch aktiven Substanzen wurde eine Veränderung der Proteinexpression festgestellt. Als Kontroll-Blot ist *beta-Actin* bei 42 kD in allen Proben zu erkennen. Das Bild zeigt das Ergebnis nach einer chemischen Reaktionsdauer von 30 min. **S** = 250 kD Proteinstandard **Ko** = unbehandelte A549-Zellen **Aza** = A549-Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin **A+T** = A549-Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A **NL3** = nicht-malignes Lungengewebe Probe 3

6. Diskussion

Epigenetische Faktoren können die Entstehung und/oder Progression von Tumoren, insbesondere auch des Lungenkarzinoms, beeinflussen. Gemeinsam mit genetischen Veränderungen regulieren sie die transkriptionelle Aktivität von Genen [137, 139]. Wenn die unterschiedlichen epigenetischen Mechanismen hierbei auch noch nicht bis ins Detail aufgeklärt sind, gehört die DNA-Methylierung doch zu einem der am besten erforschten Gebiete [316]. Sie steht in Wechselwirkung mit Histonmodifikationen, kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA beeinflussen und bewirkt so Strukturänderungen des Chromatins, die bei einer Kompaktierung zur Geninaktivierung und in weiterer Folge zur Krebsentstehung führen können [137, 262, 264-266]. Dies ist möglich, weil die methylierten CpG-Inseln vorwiegend im 5'-Promoterbereich eines Gens in der Nähe von Transkriptionsstartstellen liegen und auf diese Weise die Expression des Gens reprimieren [262, 267, 291]. Mittlerweile gibt es zahlreiche Studien, in denen aberrante Methylierung von CGIs in malignen Zellen beschrieben wurde [263]. Es wurden auch im NSCLC bereits einige Gene mit methylierten CGIs identifiziert, ein Großteil der Gene war allerdings bisher noch nicht näher auf Methylierung untersucht worden.

Es gibt verschiedene Methoden, um das Methylierungsmuster des gesamten Genoms zu analysieren [171, 418, 438]. Methylierungsanalysen von CGIs wurden in großem Umfang erstmals von Dai et al. durchgeführt [439]. Dabei wurde die **RLGS-Methode** (engl. für „restriction landmark genomic scanning“) angewandt, im Zuge derer methylierungssensitive Restriktionsendonukleasen mit GC-reichen Erkennungssequenzen eingesetzt und unmethylierte CGIs mit radioaktiven Nukleotiden „markiert“ werden. Eine indirekte Methode zur Identifizierung methylierter Gene bieten die **Genexpressions-Microarrays**, die eine Analyse der Expressionsmuster von Zellen aus NSCLC- bzw. Bronchialepithel-Zelllinien ermöglichen [440, 441]. Mit den epigenetisch aktiven Substanzen Aza-dC und/oder TSA behandelte Zellen werden auf die (Re-)Expression bestimmter Gene untersucht und das Expressionsmuster mit jenem der unbehandelten Zellen verglichen. Ein Nachteil dieser Methode ist das begrenzte Anwendungsgebiet: Nur Zelllinien können auf die Methylierung bestimmter Gene analysiert werden, während Gewebeproben mit anderen Mitteln untersucht werden müssen. Darüber hinaus ist die Validierung der durch Tumorzelllinien-Analysen erworbenen Daten anhand weiterer Untersuchungen von PatientInnenproben vonnöten, da Krebszelllinien Methylierungen in der Zellkultur erlangen können und in diesem Falle nicht die Methylierungsprofile der Tumoren von PatientInnen widerspiegeln [442, 443]. Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Methylierungsmuster von Genen ist die **BeadArray-Technologie** (Illumina GoldenGateTM Methylierungsassay), mithilfe derer bereits unterschiedliche Methylierungsmuster von Krebszelllinien verschiedenen histologischen Ursprungs sowie Methylierungsunterschiede zwischen Lungentumoren und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebe nachgewiesen wurden [444, 445]. Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Analyse von genomweit bis zu 450.000 CpG-Loci mit dieser Methode (Infinium Methylation 450K) möglich [446]. Eine andere Möglichkeit zur genomweiten Untersuchung von CGIs bietet die von Weber et al. entwickelte Methode der Isolierung methylierter DNA-Fragmente durch Immunopräzipitation unter Verwendung eines Antikörpers gegen 5-Methylcytosin (MeDIP), die mit der Microarray-Technologie kombiniert wird (**MeDIP-Chip**) [418]. Diese hat wie die zuvor beschriebene Methode den Vorteil, dass

Gewebeproben ebenso analysiert werden können wie Tumorzelllinien und wurde von Heller et al. zur genomweiten Untersuchung der Methylierungsmuster in Lungen(karzinom)geweben angewandt, deren Ergebnisse als Grundlage für diese Arbeit dienten [420]. Mittels MeDIP-Chip-Analysen von primären Tumorproben und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von 101 NSCLC-PatientInnen wurden 298 tumorspezifisch methylierte Gene identifiziert. Darunter befanden sich 254 proteinkodierende Gene wie *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2*.

Unser Ziel war es, diese fünf Gene durch **Einzelgen-Methylierungsanalysen** näher zu untersuchen und die in der MeDIP-Chip-Studie ermittelte tumorspezifische Methylierung der Gene mittels MS-HRM und genomischer Bisulfitsequenzierung (BGS) zu bestätigen. *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* spielen eine Rolle bei der Genexpression oder bei Zelladhäsionsprozessen; beides Prozesse, die in der Tumorentwicklung und/oder -progression von entscheidender Bedeutung sind [114]. Unsere Einzelgen-Methylierungsanalyse erfolgte mithilfe der relativ neuen **MS-HRM-Methode**. Die methylierungssensitive, hochauflösende Schmelzkurvenanalyse erlaubt eine analytisch hochsensitive, quantitative Untersuchung der Methylierung einzelner Loci und ermöglicht eine Detektion der Methylierungsgrade von Genen auch bei Vorliegen eines heterogenen Methylierungsmusters sowie unabhängig von ihrer genomischen Prägung. Abseits von den Geräte-Anschaffungskosten ist eine hohe Kosteneffizienz gegeben und effektives Arbeiten realisierbar. Der große Vorteil dieser Methode liegt in der schnellen Durchführung von Analysen bei einer großen Anzahl an Proben. Sie wird immer häufiger zu Forschungszwecken angewandt und könnte künftig auch eine wichtige Rolle bei diagnostischen Anwendungen spielen [447]. Für Einzelgen-Methylierungsanalysen wird jedoch derzeit noch am häufigsten die **methylierungsspezifische PCR** (MSP) angewandt. Nach der Natrium-Bisulfit-Behandlung der DNA ist durch Amplifikation der DNA unter Einsatz von methylierungsspezifischen Primern die Unterscheidung von unmethylierter und methylierter DNA möglich, die mittels anschließender Gelelektrophorese visualisiert wird. Die MSP erlaubt ebenfalls eine rasche, präzise Identifizierung methylierter Gene und erfordert gleich dem MS-HRM nur eine geringe Menge an genomischer DNA, was gerade bei Untersuchungen von PatientInnenproben vorteilhaft ist. Auch haben beide Methoden gemeinsam, dass die Wahl der richtigen Primer mitausschlaggebend für den Erfolg der Untersuchungen ist. Im Gegensatz zur MS-HRM-Analyse erlaubt die MSP allerdings nur eine qualitative Bestimmung des Methylierungsstatus und gibt keine Auskunft über den Prozentsatz des Methylierungsgrades. Die von Frommer et al. entwickelte und von uns ebenfalls durchgeführte Methode der **BGS** hingegen bietet die detailliertesten Informationen über Methylierung und Position der einzelnen CpGs in der untersuchten Region [426]. Für verlässliche Ergebnisse hinsichtlich der Prozentsätze der Methylierungen werden mehrere Klone hergestellt, wobei der Zeitaufwand und die Kosten dementsprechend höher sind. BGS ist daher für die rasche Untersuchung vieler Proben und zur Generierung einer großen Menge an Methylierungsinformationen über einzelne Gene in kurzer Zeit ungeeignet.

Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen auch unterschiedliche (Methylierungs)Ergebnisse hinsichtlich ein und desselben Gens hervorbringen. Diese Tatsache kann mit der Anwendung verschiedener Analysemethoden und der Untersuchung verschiedener Proben erklärt werden.

Die Ergebnisse unserer Analysen mittels MS-HRM zeigen in Übereinstimmung mit den präliminären Daten, dass die Gene *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* in Tumorgewebe von NSCLC-PatientInnen eine viel stärkere Methylierung aufweisen als im assoziierten Normalgewebe. Darüber hinaus konnten wir das tumorspezifische Methylierungsmuster dieser fünf Gene mittels BGS bestätigen. Im Zuge unserer Arbeit wurde in den meisten Fällen keine Methylierung der PatientInnen-Proben aus nicht-malignem Lungengewebe detektiert. Handelte es sich bei diesen Proben jedoch um methylierte DNA, so war bei der überwiegenden Mehrheit auch eine Methylierung der korrespondierenden Tumorprobe zu finden. Eine Ursache für das Vorhandensein von methylierten Allelen in nicht-malignen Lungengewebsproben ist u.U. eine Kontamination der untersuchten Proben mit angrenzenden malignen Zellen. Darüber hinaus können sich Veränderungen auf molekularer Ebene bereits in histologisch normalem Gewebe manifestiert haben, wie verschiedene Studien belegen [260, 388, 448]. Beteiligt an der Methylierung bestimmter Gene und damit eine weitere Erklärung für das Vorliegen methylierter Gene in nicht-malignem Lungengewebe ist auch der normale Alterungsprozess [271]. Für unsere Untersuchungen von Bedeutung ist allerdings der detektierte Methylierungsunterschied hinsichtlich einer deutlich höheren Methylierungsfrequenz des Tumorgewebes im Vergleich zum korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebe desselben/derselben Patienten/in. Unsere Resultate zeigen demnach eine eindeutige tumorspezifische Methylierung der Gene *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* und weisen darauf hin, dass eine epigenetische (De-)Regulierung der fünf Gene in Form von DNA-Methylierung an der Entwicklung eines malignen Phänotyps im Lungengewebe beteiligt ist.

Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Proteinexpressionsmuster gestützt, die nach der Durchführung von Western Blots eine Expression von *SFMBT2* in nicht-malignem Lungengewebe zeigen, während das Protein in Lungenkrebs-Zelllinien mit methyliertem *SFMBT2* nicht exprimiert wird. Eine andere Möglichkeit zur Überprüfung der Proteinexpression bieten immunhistochemische Methoden, wie sie von Heller et al. durchgeführt wurde [420]. Tumor- und assoziierte nicht-maligne Lungengewebsproben von 37 NSCLC-PatientInnen wurden mittels IHC durch Paraffineinbettung nach Formalinfixierung (FFPE) auf die Proteinexpression von *EVX1*, *HOXA2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* untersucht. Bei einem Großteil der Tumorproben dieser Gene (59 % – 84 %) ging das Vorhandensein einer Methylierung mit einer herabregulierten Proteinexpression einher. Eine Proteinexpression trotz Methylierung der untersuchten Gene in Tumorgewebe könnte mit einem heterogenen Methylierungsmuster oder mit anderen inaktivierenden Mechanismen erklärt werden.

Um weiter zu überprüfen, ob die Methylierung eines Gens dessen Proteinexpression beeinflusst, wurden im Zuge unserer Studie **A549-Zellen**, bei denen eine Methylierung von *SFMBT2* vorliegt, mit der demethylierenden Substanz Aza-dC und/oder dem Histondeacetylierung inhibierenden TSA behandelt und anschließend mittels Western Blots untersucht. Während die unbehandelten Zellen keine Expression von *SFMBT2* aufwiesen, zeigte sich, dass eine Behandlung der Zellen mit den epigenetisch aktiven Agenzien eine Reaktivierung des durch Methylierung inaktivierten Gens erwirken kann. Am deutlichsten war der Effekt bei Zellen zu sehen, die sowohl mit Aza-dC als auch mit TSA behandelt worden waren. Auch Heller et al. fanden anhand von MeDIP-Chip-Analysen der NSCLC-Zelllinien A549, H1993 und H2073 heraus, dass 150 der 298 in NSCLC-PatientInnenproben tumorspezifisch methylierten Gene in zumindest einer der Zelllinien methyliert

sind und eine Behandlung der Zelllinien mit Aza-dC und/oder TSA bei 40 dieser 150 Gene (27 %) zu einer Hochregulierung der Expression in zumindest einer dieser Zelllinien führt [420]. Ähnliche Ergebnisse liefern verschiedene Studien wie jene von Zhong et al., die belegt, dass bei 226 Genen nach der Behandlung von NSCLC-Zelllinien mit epigenetisch aktiven Substanzen eine Hochregulierung der Expression zu beobachten ist [441].

Diese Resultate zeigen, dass Methylierung ein wichtiger Mechanismus zur transkriptionellen Regulierung bestimmter Gene in NSCLCs sein dürfte. Warum bestimmte Gene im Zuge der Karzinogenese methyliert werden und welche biochemischen Reaktionen dabei stattfinden bedarf allerdings noch weiterer Forschung. Die von uns untersuchten Gene *EVX1*, *HOXA9*, *IRX2*, *PCDHA12* und *SFMBT2* spielen eine Rolle bei der Genexpression oder bei Zelladhäsionsprozessen; dabei handelt es sich um Prozesse, die in der Tumorentwicklung und/oder -progression von entscheidender Bedeutung sind [114].

Die klinische Relevanz unserer Resultate ergibt sich aus dem Vergleich der Methylierungsdaten der Proben mit den uns vorliegenden klinisch-pathologischen Charakteristika der untersuchten PatientInnen. Wir haben festgestellt, dass *SFMBT2* bei PatientInnen mit Plattenepithelkarzinom (SCC) häufiger methyliert ist als bei PatientInnen mit Adenokarzinom (ADC). Darüber hinaus korreliert eine Methylierung von *EVX1* und *SFMBT2* mit einem höheren Lebensalter der PatientInnen. Die Methylierung von *HOXA9* bei SCC-PatientInnen wiederum steht mit einer kürzeren DFS in Zusammenhang, verglichen mit PatientInnen ohne *HOXA9*-Methylierung.

Über weitere proteinkodierende Gene mit tumorspezifischem Methylierungsmuster wurde bereits in anderen Studien berichtet [380, 381]. Bis dato wurden die Methylierungen bestimmter Gene bei NSCLC-PatientInnen allerdings erst in wenigen Fällen mit einer potenziellen klinischen Relevanz in Verbindung gebracht. So wurde kürzlich ein Zusammenhang zwischen der tumorspezifischen Methylierung der miRNA-kodierenden *miR-9-3* bei SCC-PatientInnen und einem kürzeren DFS/OS festgestellt [410]. Beobachtet wurde auch, dass je nach NSCLC-Subtyp ein unterschiedlicher Methylierungsgrad bei bestimmten Genen vorliegen kann. Beispielsweise wurde entdeckt, dass einige proteinkodierende Gene (z.B. *APC*, *CCND2*, *CDH13*, *KCNH5*, *RARβ*, *RUNX3*) in ADCs deutlich stärker methyliert sind als in SCCs [379, 382, 383]. Eine andere Studie hat ergeben, dass die Methylierung der Gene *p16*, *CDH13*, *RASSF1A* und *APC* bei NSCLC-PatientInnen im Krankheitsstadium I, die mit einer kurativen Resektion therapiert werden, mit einer frühen Rekurrenz des Tumors korreliert [389]. Weiters wurde entdeckt, dass die Methylierung von *MGMT* mit schlechteren Überlebenschancen von NSCLC-PatientInnen assoziiert ist und dass die Methylierung von *DAL-1* häufiger bei PatientInnen mit Lymphknotenbefall zu beobachten ist [416, 449]. Eine mögliche epigenetische Regulierung durch Methylierung der Gene *HOXA9*, *PCDHA12* und *SFMBT2* in NSCLC-PatientInnen war bisher nicht bekannt, wohingegen die tumorspezifische Methylierung von *EVX1* und *IRX2* bei NSCLC-PatientInnen in der Literatur bereits beschrieben worden ist [450].

Erkenntnisse aus unserer und ähnlichen Studien weisen auf eine diagnostische/prognostische Bedeutung von methylierten Genen im Lungengewebe im allgemeinen sowie auf die Bedeutung der Methylierung von *SFMBT2* und *HOXA9* im Speziellen als prognostischer Faktor bei SCC-PatientInnen hin.

Forschungsergebnisse dieser Art schüren die Hoffnung, in Zukunft eine Verbesserung der Überlebensraten von LungenkrebspatientInnen durch die frühzeitige Detektion von aberrant methylierten Genen in Form von Biomarkern zu erreichen. Korreliert beispielsweise die Methylierung eines bestimmten Gens aus Tumorgewebe mit einem hohen metastatischen Potential oder mit einem erhöhten Risiko einer Rekurrenz nach einer Resektion, könnte eine dementsprechende Therapieplanung vorgenommen werden. Doch Methylierungen können auch in histologisch unauffälligem Lungengewebe vorhanden und bereits vor dem Auftreten des eigentlichen invasiven Karzinoms ein Hinweis auf die molekularen Veränderungen im Epithel sein [260, 388, 448]. Das wirft die Möglichkeit auf, Veränderungen bei Personen, die einer Hochrisikogruppe zugerechnet werden können (z.B. RaucherInnen), bereits vor einer klinischen Evidenz zu detektieren, eine potentielle Erkrankung zu erkennen und entsprechende Therapiemaßnahmen setzen zu können. TP53- und Ras-Mutationen etwa können ein Jahr vor der Lungenkrebsdiagnose im Sputum von PatientInnen nachgewiesen werden [373, 448]. In welchem Ausmaß dies auf durch Methylierung inaktivierte Gene zutrifft, ist individuell zu untersuchen. Von potentieller klinischer Relevanz könnte die Methylierung von *p16*, *RASSF1A*, *APC* und *CDH13* in Lungenkarzinomen sein [393-397]. Als günstig in diesem Zusammenhang erweist sich, dass biologisches Material von den PatientInnen anhand von Serum- oder Blutproben relativ leicht zugänglich ist. Der Nachweis der Biomarker wäre auch durch Entnahme von Bronchialsekret oder im Zuge von Operationen anhand von Gewebeproben möglich [389, 451].

Die Fragen, die sich ob der Möglichkeiten durch Forschung an und mit Biomarkern, ergeben, sind vielschichtig. Zunächst: Wie hoch ist das diagnostische/prognostische Potential aus dem gewonnenen biologischen Material? Ist davon auszugehen, dass ausreichende Mengen an (Tumor-) DNA im Blut, Sputum, sonstigen Körperzellen vorhanden sind, um die Detektion eines bestimmten Markers bereits in frühen Stadien der Erkrankung zu ermöglichen? Darüber hinausgehend besitzen Tumormarker im Blut keine Organspezifität. Das bedeutet, dass methylierte Gene, die im Blut zirkulieren, nicht zwangsläufig von einem Lungenkrebs herkommen müssen, sondern durch einen anderen Tumor verursacht sein könnten. Nicht unerheblich ist auch die Tatsache, dass periphere Lungentumoren durch Biomarker in Sputum aus der zentralen Lunge möglicherweise nicht erkannt werden. Eine weitere Frage, die sich angesichts der unterschiedlichen Detektionsmöglichkeiten stellt, ist jene nach der idealen Methode zur Bestimmung der Methylierung.

Bei der Suche nach bzw. Anwendung von Biomarkern muss überdies auf die jeweilige Fragestellung geachtet werden. Ein Marker kann beispielsweise zur Abschätzung des Risikos, an Lungenkrebs zu erkranken, eingesetzt werden. Der prognostische Aussagewert kann aber auch für die Risikoabschätzung einer postoperativen Rekurrenz bedeutend sein. Prädiktive Biomarker hingegen geben Hinweise auf die Sensitivität bzw. Resistenz der PatientInnen gegenüber bestimmten (Chemo-)Therapieformen, auf die sie aller Wahrscheinlichkeit nach (nicht) ansprechen werden, wenn das jeweilige Gen methyliert und funktionslos in den PatientInnen vorgefunden wird. Nicht zuletzt könnten auch sogenannte pharmakodynamische Biomarker herangezogen werden, die Auskunft über die optimale Medikamenten-Dosis für den/die betreffende/n PatientIn geben [452-455].

Um festlegen zu können, wie die PatientInnenauswahl für bestimmte Therapieoptionen idealerweise zu erfolgen hat, ist eine genaue Kenntnis der unzähligen genetischen und epigenetischen Mechanismen, die zu malignen Veränderungen führen, sowie eine optimale

Detektionsmethode notwendig. Dazu gehört das Studium der (potentiellen) Biomarker und deren unterschiedliches Auftreten im Laufe der Pathogenese von Lungenkrebs, aber auch die Entwicklung von Techniken für eine schnelle, sensitive Detektion der Markersignale. Zu hinterfragen ist weiters, ob bzw. welche Gene gemeinsam mit anderen einer malignen, tumorbegünstigenden Veränderung unterlaufen und welche Genkombinationen besonders schädlich sind [456]. Dasselbe gilt für die Methylierung bestimmter Gene: Im Wissen über deren Methylierungsmuster in der Gruppe lässt sich möglicherweise bestimmen, ob/welche onkologischen Medikamente kurative Wirkung zeigen. Mittels genomweiter Untersuchungen auf (epigenetische) Modifikationen in Lungengewebe könnten zukünftig maligne Veränderungen detektiert, der Verlauf der Erkrankung eingeschätzt und/oder eine Behandlung mit epigenetischen Agenzien geplant werden.

Infolge der hochkomplexen molekularen Ursachen der Krebsentstehung haben Lungenkrebs-PatientInnen, bei denen eine Resektion des Tumors vorgenommen werden kann, einen völlig anderen biologischen Hintergrund als PatientInnen in fortgeschrittenem Krankheitsstadium [453]. Doch auch bei NSCLC-PatientInnen in einem ähnlichen klinischen Stadium mit ähnlicher Tumorphistologie werden aufgrund der heterogenen Erscheinungsform der Tumore unterschiedliche Behandlungserfolge erzielt [31]. Daher erkennt man immer häufiger die Notwendigkeit, herkömmliche Therapien durch eine individuellere Behandlungsmethode zu ersetzen. Der Vorteil nichtspezifischer medikamentöser Behandlung liegt zwar in der Möglichkeit, multiple Defekte gleichzeitig beheben zu können, jedoch besteht in diesem Fall auch das verstärkte Risiko toxischer Wirkungen und weiterer Krebsinduktionen [401]. Hochselektive, gezielte Krebstherapien sollen cytotoxische Medikation zwar nicht ablösen, jedoch sinnvoll ergänzen [457]. Mit der zunehmenden Erforschung molekularer Mechanismen wird an der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien gearbeitet. Ziel ist die Etablierung weiterer Wirkstoffe, die onkogene Funktionen blockieren, der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen Wachstumsfaktoren und -rezeptoren, Entwicklung von Angiogeneseinhibitoren, Apoptose-Modulatoren und auch Impfstoffen sowie Anwendung von Gentherapien [66]. Auch die Nanotechnologie spielt in Forschung und Therapie eine Rolle [458, 459]. Ein großes Forschungsfeld widmet sich jedoch auch der Untersuchung von Wirkung und Optimierung demethylierender Substanzen.

Gerade beim Lungenkarzinom sind derartige Entwicklungen zu begrüßen, da Lungenkrebs-patientInnen in vielen Fällen keiner Operation unterzogen werden können und auf geeignete Chemo- und/oder Strahlentherapie angewiesen sind [14]. Ein Problem in Hinblick auf die Behandlung mit Chemotherapien zeigt sich allerdings anhand von Zellen, die eine Resistenz gegen die Medikamente oder alternative Überlebensstrategien entwickeln [460]. Beobachtet wurde etwa, dass viele NSCLC-PatientInnen zunächst gut auf die Behandlung mit EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren (EGFR-TKI) ansprechen, nach einiger Zeit jedoch nicht mehr auf die Therapie reagieren. Wird EGFR-TKI nach einer Behandlungspause allerdings wieder eingesetzt, ist eine Reaktion auf das Medikament oft erneut gegeben [461, 462]. An der Entstehung derartiger (teils vorübergehender) Resistenzen sind Veränderungen der Expression bestimmter Gene und Proteine beteiligt, z.B. durch Mutationen wie T790M im *EGFR*-Gen. Auch Methylierungsvorgänge dürften eine Rolle spielen [463, 464]. Eine Kombination aus neuartigen, gezielten Krebstherapien unter Einsatz von epigenetisch aktiven Substanzen mit herkömmlichen Methoden wie Signaltransduktionsinhibitoren oder cytotoxischen Behandlungen scheint daher unter Umständen zielführend [465].

Die zielgerichtete Krebstherapie hat bereits Veränderungen bei den Behandlungsmöglichkeiten von fortgeschrittenem NSCLC bewirkt. DNMT-Inhibitoren werden zusammen mit HDAC-Inhibitoren zwar bereits eingesetzt, jedoch sind die Resultate oft enttäuschend. Ein genaues Verständnis der Wirkungsweise dieser Medikamente ist noch nicht vorhanden, und auch die optimale Dosierung wirft noch Fragen auf [171, 453]. Herausforderungen bei der Behandlung von PatientInnen mit dem demethylierenden Agens Aza-dC ergeben sich aus deren Instabilität in wässriger Lösung und der myelosuppressiven Wirkung bei hohen Dosisgaben, da nicht nur die Proliferation von sich rapide teilenden Krebszellen, sondern auch die Produktion von Blutzellen blockiert werden [139]. Des weiteren könnten demethylierende Medikamente auch Gene aktivieren, die keine CGIs in ihrer Promoterregion haben oder die unmethyliert sind [466-468]. Eine globale Hypomethylierung von (auch gesunden) Zellen gilt es zu vermeiden, da diese zur Aktivierung von Onkogenen führen kann und/oder genomische Instabilität begünstigt. Das Optimum wäre daher eine gezielte Reversion der Methylierung einzelner Gene, die zum jetzigen Zeitpunkt leider noch nicht möglich ist [171]. Weiters ist anzuführen, dass Methylierung die ungünstige Tendenz aufweist, nach Entfernung des Inhibitors wieder in den demethylierten Zustand der CGIs zurückzugehen, was eine De-novo-Methylierung des Zielgens und erneute Inaktivierung bedeuten [469]. Dennoch gibt es bereits vielversprechende Studien, die über Behandlungserfolge berichten können [470]. Als besonders aussichtsreich bei PatientInnen mit soliden Tumoren wie dem NSCLC hat sich z.B. die Hydroxamsäure SAHA erwiesen, die als Histondeacetylase-Inhibitor die Effizienz einer Chemotherapie zu steigern scheint und zu einer Verbesserung der Überlebensraten beiträgt [471, 472]. Wenn auch der Einsatz von epigenetisch aktiven Substanzen allein für gewöhnlich keine Heilung verspricht, wird umso mehr Hoffnung in den kurativen Effekt von DNMT-Inhibitoren und HDIs in Kombination mit anderen Methoden oder Chemotherapeutika gelegt [390, 473].

Was die Kosten personalisierter und kombinierter Therapieformen anbelangt, gehen klinischer Nutzen und ökonomische Erfordernisse vielleicht Hand in Hand: Für Routineuntersuchungen betreffend Biomarker müssen zwar hohe finanzielle Mittel aufgewendet werden, jedoch wird dadurch eine individuelle Zuordnung der PatientInnen zur erfolgversprechendsten Therapie ermöglicht. Auf diese Weise wird nicht nur der Behandlungserfolg optimiert und der größtmögliche therapeutische Nutzen für die PatientInnen erzielt, sondern es wird auch der Einsatz von teuren Medikamenten bei Personengruppen vermieden, die auf bestimmte Therapien nicht ansprechen [452, 474].

Wenn viele der hier angesprochenen Überlegungen auch noch weit in die Zukunft reichen, haben sie in Anbetracht der fortschreitenden Errungenschaften in der Forschungswelt dennoch ihre Berechtigung. Eine der größten Herausforderungen in Hinblick auf zukünftige Behandlungsmethoden liegt sicher in der Umsetzung der Forschungsergebnisse hin zu klinischer Anwendung [453]. Eines Tages wird vielleicht im Rahmen einer individuellen Betreuung jede/r an Lungenkrebs Erkrankte einer genomweiten (epi)genetischen Untersuchung unterzogen, um den PatientInnen im Anschluss daran ein maßgeschneidertes Behandlungsprogramm mit minimalen Nebenwirkungen und einem maximalen Therapieerfolg bis hin zur vollständigen Heilung anbieten zu können. Wenn bis dahin auch noch viel Forschungsarbeit vor uns liegt, so konnten wir mit unseren Untersuchungen und der Identifizierung tumorspezifisch methylierter Gene doch einen Beitrag zur weiteren Aufklärung der epigenetischen Veränderungen im Lauf der Tumorentstehung und/oder -progression beim NSCLC leisten.

Abkürzungen

ADC	adenocarcinoma / Adenokarzinom
AGT	O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
ASR	altersstandardisierte Rate
ATP	Adenosintriphosphat
Aza-dC	5-Aza-2'-Deoxycytidin
BAC	bronchioloalveolar carcinoma / bronchiolo-alveoläres Karzinom
BaP	Benzo[α]pyren (BaP)
BER	base excision repair / Basenexzision
BGS	genomische Bisulfitsequenzierung
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin Rinderalbumin
BSP	bisulfite sequencing primer
BPDE	Benzo[a]pyren-7,8-dihydroxy-9,10-Epoxid
CDK	cyclin-dependent kinase / Cyclin-abhängige Kinase
CGI	CpG-Insel
CpG	cytosine-phosphate-guanine / Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotid
DAPK	death associated protein kinase
DFS	disease-free survival / krankheitsfreies Überleben
DNA	desoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
ECM	extra cellulare matrix / extrazelluläre Matrix
EGF	epidermal growth factor / epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	EGF-Rezeptor
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EVX1	even-skipped homeo box homolog 1
EZH2	enhancer of zeste homologue 2
FAS	fatty acid synthase Fettsäure-Synthase
FBS	fetal bovine serum / fötales Rinderserum

FGF	fibroblast growth factor / Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GDP	Guanosindiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GSTP1	glutathione S transferase P1 / Glutathiontransferase 1
GTP	Guanosintriphosphat
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase-Komplex
HDI	Histondeacetylase-Inhibitor
HKMT	Histon-Lysin-Methyltransferase
HOXA9	homeobox A9
HRP	horseradish peroxidase / Meerrettichperoxidase
IGF	insulin-like growth factor / insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IRX2	iroquois homeobox protein 1
LCC	large-cell carcinoma / großzelliges Bronchialkarzinom
LINE	long interspersed nuclear element
LOH	loss of heterozygosity / Verlust der Heterozygotie
LOI	loss of imprinting / Verlust genetischer Prägung
MBD	methyl-CpG-bindende Domäne
MBP	methyl-CpG-bindendes Protein
MeCP2	methyl-CpG-bindendes Protein 2
MeDIP-Chip	Kombination aus Immunpräzipitation methylierter DNA Fragmente (MeDIP) mit Microarray Analysen (MeDIP-Chip)
MGMT	<i>O</i> ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
miRNA	microRNA
MMP-2	Matrix-Metalloprotease 2
MS-HRM	methylation-specific high-resolution melting / methylierungsspezifische hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NAT	N-Acetyl-Transferasen
NER	nucleotide excision repair Nukleotidexzision
NNAL	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNK	4-(Methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanon, nicotine-derived nitrosamine ketone / Nikotin-Nitrosaminoketon
NNN	<i>N</i> '-Nitrosonornicotine / <i>N</i> '-Nitrosonornikotin
NSCLC	non-small cell lung cancer / nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom

nt	Nukleotide
NuRD	nucleosome remodelling and histone deacetylase complex / Nukleosomen-Remodeling- und Histondeacetylase-Komplex
OS	overall survival / Gesamtüberleben
PAK, PAH	polycyclic aromatic hydrocarbons / polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PcG	Polycomb-Gruppe
PCDHA12	protocadherin alpha 12
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid; Hydroxamsäure, Handelsname: Vorinostat = Arzneistoff zur Histon-Deacetylase-Inhibition
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SCC	squamous cell carcinoma / Plattenepithelkarzinom
SCLC	small cell lung cancer / kleinzelliges Lungenkarzinom
SFMBT2	scm-related gene containing four mbt domains 2
SNP	single nucleotide polymorphism / Einzelnukleotid-Polymorphismus
TGF- β	transforming growth factor beta / Transformierender Wachstumsfaktor beta
TSA	Trichostatin A
TrxG	Trithorax-Gruppe
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TSP-1	Thrombospondin 1
UGT	Uridin-5'-diphosphat-glucuronosyl-Transferasen
UHRF1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1
VEGF-A	vascular endothelial growth factor A / vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Altersstandardisierte Lungenkrebsinzidenz- und -mortalitätsraten (ASR) weltweit, nach Geschlecht und Region	S. 14
Abb. 2:	Enzymatische Transformation von Benzo[a]pyren (BaP) zum kanzerogenen Benzo[a]pyren-7,8-dihydroxy-9,10-Epoxid (BPDE)	S. 18
Abb. 3:	DNA-Addukt BaP-7,8-diol-9,10-Epoxid	S. 19
Abb. 4:	Chemische Umwandlung von Nikotin in seine kanzerogenen N-Nitrosamine am Beispiel von NNK und NNN	S. 19
Abb. 5:	Beispiel für die Formation von Methyl- und Pyridyloxobutyl-Addukten durch NNK und NNN	S. 20
Abb. 6:	Cytosinmethylierung durch DNA-Methyltransferasen	S. 33
Abb. 7:	CpG-Inseln als Zielgruppe der Promoter-Hypermethylierung	S. 34
Abb. 8:	Direkte und indirekte Repression eines Gens durch Methylierung von CGIs	S. 35
Abb. 9:	Zusammenfassende Darstellung des Übergangs vom aktiven zum transkriptionell inaktiven Chromatinstatus	S. 38
Abb. 10:	Beispiel der Methylierungsunterschiede anhand zweier NSCLC-Subtypen	S. 40
Abb. 11:	Methylierungsunterschiede zwischen RaucherInnen und NichtraucherInnen	S. 41
Abb. 12:	DNMT- und Histondeacetylase-Inhibitoren	S. 43
Abb. 13:	Bisulfitkonvertierung von unmethyliertem Cytosin	S. 51
Abb. 14:	Natrium-Bisulfit-Behandlung genomischer DNA mit anschließender PCR	S. 51
Abb. 15:	Beispielbild für Primerdesign mittels Methyl Primer Express®	S. 54
Abb. 16:	Methylierungssensitive, hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM)	S. 55
Abb. 17:	Thermo-optische Analysemethode zur quantitativen Bestimmung der DNA-Methylierung	S. 55
Abb. 18:	Rotor-Gene Q	S. 56
Abb. 19:	Gelelektrophorese nach Amplifikation von PatientInnen-DNA mit dem Primerpaar für PCDHA12	S. 59
Abb. 20:	Klonierung zur Herstellung und Vervielfältigung rekombinanter DNA für die Sequenzierungsanalyse	S. 60
Abb. 21:	pCR®4-TOPO Vektor	S. 62
Abb. 22:	Eichkurve von BSA	S. 65
Abb. 23:	Precision Plus Protein WesternC Standards	S. 67
Abb. 24:	Aufbau eines Western Blots nach der Semi-Dry-Variante	S. 68
Abb. 25:	Primertest am Beispiel von <i>HOXA9</i> mit Methylierungsstandards	S. 71

Abb. 26:	MS-HRM-Analyse von <i>EVX1</i> in NSCLC-Zelllinien	S.73
Abb. 27:	MS-HRM-Analyse von <i>HOXA9</i> in NSCLC-Zelllinien	S.74
Abb. 28:	MS-HRM-Analyse von <i>IRX2</i> in NSCLC-Zelllinien	S.75
Abb. 29:	MS-HRM-Analyse von <i>PCDHA12</i> in NSCLC-Zelllinien	S.76
Abb. 30:	MS-HRM-Analyse von <i>SFMBT2</i> in NSCLC-Zelllinien	S.77
Abb. 31:	MS-HRM-Analyse von <i>EVX1</i> in Tumor- und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von NSCLC-PatientInnen	S.79
Abb. 32:	MS-HRM-Analyse von <i>HOXA9</i> in Tumor- und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von NSCLC-PatientInnen	S.80
Abb. 33:	MS-HRM-Analyse von <i>IRX2</i> in Tumor- und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von NSCLC-PatientInnen	S.81
Abb. 34:	MS-HRM-Analyse von <i>PCDHA12</i> in Tumor- und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von NSCLC-PatientInnen	S.82
Abb. 35:	MS-HRM-Analyse von <i>SFMBT2</i> in Tumor- und korrespondierenden nicht-malignen Lungengewebsproben von NSCLC-PatientInnen	S.83
Abb. 36:	MS-HRM-Analyse von fünf Genen in primärem Tumor- und korrespondierendem nicht-malignen Lungengewebe von 97 NSCLC-PatientInnen	S.84
Abb. 37:	Ergebnisse der genomischen Bisulfitsequenzierung	S.85
Abb. 38:	DFS und Gesamtüberleben von PatientInnen mit und ohne <i>HOXA9</i> -Methylierung	S.86
Abb. 39:	Western Blot zur Detektion der <i>SFMBT2</i> -Expression in nicht-malignen Lungengeweben von NSCLC-PatientInnen	S.87
Abb. 40:	Western Blot zur Detektion der <i>SFMBT2</i> -Expression in nicht-malignen Lungengeweben und NSCLC-Zelllinien	S.88
Abb. 41:	Western Blot zur Detektion der <i>SFMBT2</i> -Expression in nicht-malignem Lungengewebe und unbehandelter bzw. mit demethylierenden und/oder histondeacetylierenden Agenzien behandelter Zelllinie A549	S.89

Quellenangaben

1. Witschi, H., *A short history of lung cancer*. Toxicol Sci, 2001. **64**(1): p. 4-6.
2. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
3. World Health Organization, *Gender in lung cancer and smoking research*, <http://www.who.int/gender/documents/en/lungcancerlow.pdf>, 2004. (Stand: 20.08.2011).
4. Statistik Austria, http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/index.html (Stand: 21.08.2011).
5. Statistik Austria, *Jahrbuch der Gesundheitsstatistik 2009*. 2010.
6. Österreichische Krebshilfe-Krebsgesellschaft, *Lungenkrebs. Diagnose - Therapie - Nachsorge*, <http://www.krebshilfe.net> (Stand: 21.08.2011).
7. Brambilla, E., et al., *The new World Health Organization classification of lung tumours*. Eur Respir J, 2001. **18**(6): p. 1059-68.
8. World Health Organization, IARC, *GLOBOCAN*. <http://globocan.iarc.fr>, 2008.
9. Köhler, D., B. Schönhofer, and T. Voshaar, *Pneumologie: Ein Leitfaden für rationales Handeln in Klinik und Praxis*. Thieme Verlag, 2010.
10. National Cancer Institute at the National Institutes of Health, <http://www.cancer.gov/cancertopics>, (Stand: 24.08.2011).
11. Pschyrembel online, *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 261. Aufl., <http://www.wdg.pschyrembel.de> (Stand: 05.01.2012).
12. Roggli, V.L., et al., *Lung cancer heterogeneity: a blinded and randomized study of 100 consecutive cases*. Hum Pathol, 1985. **16**(6): p. 569-79.
13. Hilbe, W., *"Targeted Therapies" beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom*, in Uni-Med Verlag AG Bremen, 2007.

14. Manegold, C., *Non-Small Cell Lung Cancer Treatment*. Uni-Med Verlag AG Bremen, 2010.
15. Hayat, M.A., *Molecular genetics; Lung and Breast Carcinomas* in *Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas, Vol. 1*, 2004, Elsevier Academic Press: USA, UK.
16. Wiener Krebshilfe-Krebsgesellschaft., *100 Antworten auf Ihre Fragen zum Thema Lungenkrebs*. 2008.
17. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, *Tobacco Smoke and Involuntary Smoking*. 2002. **83**.
18. Doll, R. and A.B. Hill, *Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report*. Br Med J, 1950. **2**(4682): p. 739-48.
19. Doll, R., et al., *Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors*. BMJ, 2004. **328**(7455): p. 1519.
20. Wynder, E.L. and E.A. Graham, *Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases*. J Am Med Assoc, 1950. **143**(4): p. 329-36.
21. Ezzati, M., et al., *Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs*. Int J Cancer, 2005. **116**(6): p. 963-71.
22. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
23. Peto, R., et al., *Mortality from smoking in developed countries 1950-2000. 2nd ed.* International Union Against Cancer (UICC), 2006.
24. Jemal, A., et al., *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(23): p. 1672-94.

25. Bray, F.I. and E. Weiderpass, *Lung cancer mortality trends in 36 European countries: secular trends and birth cohort patterns by sex and region 1970-2007*. Int J Cancer, 2010. **126**(6): p. 1454-66.
26. Jemal, A., et al., *Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(8): p. 1893-907.
27. Lam, W.K., N.W. White, and M.M. Chan-Yeung, *Lung cancer epidemiology and risk factors in Asia and Africa*. Int J Tuberc Lung Dis, 2004. **8**(9): p. 1045-57.
28. Youlten, D.R., S.M. Cramb, and P.D. Baade, *The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(8): p. 819-31.
29. Liu, B.Q., et al., *Emerging tobacco hazards in China: 1. Retrospective proportional mortality study of one million deaths*. BMJ, 1998. **317**(7170): p. 1411-22.
30. Behera, D. and T. Balamugesh, *Lung cancer in India*. Indian J Chest Dis Allied Sci, 2004. **46**(4): p. 269-81.
31. Herbst, R.S., J.V. Heymach, and S.M. Lippman, *Lung cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(13): p. 1367-80.
32. Hoffmann, D. and S. Hecht, *Handbook of Experimental Pharmacology*. 94/1 ed. Cooper CS und Grover PL, Springer Verlag, Heidelberg 1990.
33. Hoffmann, D., I. Hoffmann, and K. El-Bayoumy, *The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder*. Chem Res Toxicol, 2001. **14**(7): p. 767-90.
34. Pfeifer, G.P., et al., *Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers*. Oncogene, 2002. **21**(48): p. 7435-51.
35. Gazdar, A.F. and J.D. Minna, *Cigarettes, sex, and lung adenocarcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(21): p. 1563-5.
36. Sekido, Y., K.M. Fong, and J.D. Minna, *Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1378**(1): p. F21-59.

37. Jiang, H., et al., *Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry*. Chem Res Toxicol, 2007. **20**(9): p. 1331-41.
38. Miller, J.A., *Research in chemical carcinogenesis with Elizabeth Miller--a trail of discovery with our associates*. Drug Metab Rev, 1994. **26**(1-2): p. 1-36.
39. Guengerich, F.P. and T. Shimada, *Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes*. Mutat Res, 1998. **400**(1-2): p. 201-13.
40. Guengerich, F.P., *Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity*. Chem Res Toxicol, 2001. **14**(6): p. 611-50.
41. Armstrong, R., *Comprehensive Toxicology: Biotransformation*. Hrsg.: Guengerich FP, Elsevier Science, New York, 1997. **3**: p. 307-327.
42. Burchell, B., et al., *UDP-glucuronosyltransferases*. Hrsg.: Guengerich FP, Comprehensive toxicology: biotransformation. Vol 3, Elsevier Science, Oxford, 1997: p. 401-436.
43. Duffel, M., *Sulfotransferases*. Hrsg.: Guengerich FP, Comprehensive toxicology: biotransformation. Vol 3, Elsevier Science, Oxford, 1997: p. 365-384.
44. Bouchardy, C., et al., *Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer*. Lung Cancer, 2001. **32**(2): p. 109-12.
45. Tang, D., et al., *Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6708-12.
46. Hecht, S.S., *Tobacco smoke carcinogens and lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(14): p. 1194-210.
47. Spitz, M.R., et al., *Dietary intake of isothiocyanates: evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000. **9**(10): p. 1017-20.
48. Spitz, M.R., et al., *Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1354-7.

49. Seo, K.Y., S.A. Jelinsky, and E.L. Loechler, *Factors that influence the mutagenic patterns of DNA adducts from chemical carcinogens*. Mutat Res, 2000. **463**(3): p. 215-46.
50. Hecht, S.S., *Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines*. Chem Res Toxicol, 1998. **11**(6): p. 559-603.
51. Hoffmann, D., et al., *Five leading U.S. commercial brands of moist snuff in 1994: assessment of carcinogenic N-nitrosamines*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(24): p. 1862-9.
52. Cancer, I.A.f.R.o., *WHO IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 89: Some tobacco-specific N-Nitrosamines*. 2007: p. 420-583.
53. Christmann, M., et al., *O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: Enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1816**(2): p. 179-190.
54. Foiles, P.G., et al., *Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine-DNA adducts in smokers and nonsmokers*. Chem Res Toxicol, 1991. **4**(3): p. 364-8.
55. Hecht, S.S. and D. Hoffmann, *Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke*. Carcinogenesis, 1988. **9**(6): p. 875-84.
56. Denissenko, M.F., et al., *Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53*. Science, 1996. **274**(5286): p. 430-2.
57. Wiencke, J.K., et al., *Early age at smoking initiation and tobacco carcinogen DNA damage in the lung*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(7): p. 614-9.
58. Sanchez-Cespedes, M., et al., *Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1309-13.
59. Massion, P.P., et al., *Smoking-related genomic signatures in non-small cell lung cancer*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(11): p. 1164-72.
60. Yoon, J.H., et al., *Methylated CpG dinucleotides are the preferential targets for G-to-T transversion mutations induced by benzo[a]pyrene diol epoxide in mammalian cells:*

- similarities with the p53 mutation spectrum in smoking-associated lung cancers.* Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7110-7.
61. Denissenko, M.F., et al., *Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human P53 gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3893-8.
 62. Singer, B. and J.M. Essigmann, *Site-specific mutagenesis: retrospective and prospective.* Carcinogenesis, 1991. **12**(6): p. 949-55.
 63. Greenblatt, M.S., et al., *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis.* Cancer Res, 1994. **54**(18): p. 4855-78.
 64. Merlo, A., et al., *5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers.* Nat Med, 1995. **1**(7): p. 686-92.
 65. Otterson, G.A., et al., *Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB.* Oncogene, 1994. **9**(11): p. 3375-8.
 66. Zochbauer-Muller, S., A.F. Gazdar, and J.D. Minna, *Molecular pathogenesis of lung cancer.* Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 681-708.
 67. Sozzi, G., et al., *Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions.* Cancer Res, 1998. **58**(22): p. 5032-7.
 68. Mills, N.E., et al., *Increased prevalence of K-ras oncogene mutations in lung adenocarcinoma.* Cancer Res, 1995. **55**(7): p. 1444-7.
 69. Westra, W.H., et al., *K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung.* Cancer Res, 1996. **56**(9): p. 2224-8.
 70. Westra, W.H., et al., *K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung.* Cancer, 1993. **72**(2): p. 432-8.
 71. Fearnhead, N.S., M.P. Britton, and W.F. Bodmer, *The ABC of APC.* Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 721-33.

72. Bryant, A. and R.J. Cerfolio, *Differences in epidemiology, histology, and survival between cigarette smokers and never-smokers who develop non-small cell lung cancer*. Chest, 2007. **132**(1): p. 185-92.
73. Ryberg, D., et al., *Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients*. Cancer Res, 1994. **54**(22): p. 5801-3.
74. Kure, E.H., et al., *p53 mutations in lung tumours: relationship to gender and lung DNA adduct levels*. Carcinogenesis, 1996. **17**(10): p. 2201-5.
75. Ahrendt, S.A., et al., *Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung*. Cancer, 2001. **92**(6): p. 1525-30.
76. Sasco, A.J., M.B. Secretan, and K. Straif, *Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence*. Lung Cancer, 2004. **45 Suppl 2**: p. S3-9.
77. Wynder, E.L. and D. Hoffmann, *Smoking and lung cancer: scientific challenges and opportunities*. Cancer Res, 1994. **54**(20): p. 5284-95.
78. Morabia, A. and E.L. Wynder, *Cigarette smoking and lung cancer cell types*. Cancer, 1991. **68**(9): p. 2074-8.
79. Zheng, T., et al., *Time trend and the age-period-cohort effect on the incidence of histologic types of lung cancer in Connecticut, 1960-1989*. Cancer, 1994. **74**(5): p. 1556-67.
80. Chari, R., et al., *Effect of active smoking on the human bronchial epithelium transcriptome*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 297.
81. Tong, L., et al., *Lung carcinoma in former smokers*. Cancer, 1996. **78**(5): p. 1004-10.
82. Piyathilake, C.J., et al., *Altered global methylation of DNA: an epigenetic difference in susceptibility for lung cancer is associated with its progression*. Hum Pathol, 2001. **32**(8): p. 856-62.
83. Ruosaari, S.T., et al., *Aberrations of chromosome 19 in asbestos-associated lung cancer and in asbestos-induced micronuclei of bronchial epithelial cells in vitro*. Carcinogenesis, 2008. **29**(5): p. 913-7.

84. World Health Organization, *Fact Sheet N° 291, Radon and Cancer*. 2009.
85. Belinsky, S.A., et al., *Plutonium targets the p16 gene for inactivation by promoter hypermethylation in human lung adenocarcinoma*. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(6): p. 1063-7.
86. National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC, *Public Health Service: 11th Report on Carcinogens* 2005
87. Boffetta, P. and F. Nyberg, *Contribution of environmental factors to cancer risk*. *Br Med Bull*, 2003. **68**: p. 71-94.
88. Thun, M.J., et al., *Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies*. *PLoS Med*, 2008. **5**(9): p. e185.
89. Stabile, L.P., et al., *Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor alpha and beta and show biological responses to estrogen*. *Cancer Res*, 2002. **62**(7): p. 2141-50.
90. Fasco, M.J., G.J. Hurteau, and S.D. Spivack, *Gender-dependent expression of alpha and beta estrogen receptors in human nontumor and tumor lung tissue*. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. **188**(1-2): p. 125-40.
91. Syrjanen, K.J., *HPV infections and lung cancer*. *J Clin Pathol*, 2002. **55**(12): p. 885-91.
92. Chen, Y.C., et al., *Lung adenocarcinoma and human papillomavirus infection*. *Cancer*, 2004. **101**(6): p. 1428-36.
93. Subramanian, J. and R. Govindan, *Lung cancer in never smokers: a review*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(5): p. 561-70.
94. Nitadori, J., et al., *Association between lung cancer incidence and family history of lung cancer: data from a large-scale population-based cohort study, the JPHC study*. *Chest*, 2006. **130**(4): p. 968-75.
95. Wu, A.H., et al., *Family history of cancer and risk of lung cancer among lifetime nonsmoking women in the United States*. *Am J Epidemiol*, 1996. **143**(6): p. 535-42.

96. Schwartz, A.G., P. Yang, and G.M. Swanson, *Familial risk of lung cancer among nonsmokers and their relatives*. Am J Epidemiol, 1996. **144**(6): p. 554-62.
97. Hwang, S.J., et al., *Lung cancer risk in germline p53 mutation carriers: association between an inherited cancer predisposition, cigarette smoking, and cancer risk*. Hum Genet, 2003. **113**(3): p. 238-43.
98. Sanders, B.M., et al., *Non-ocular cancer in relatives of retinoblastoma patients*. Br J Cancer, 1989. **60**(3): p. 358-65.
99. Bell, D.W., et al., *Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR*. Nat Genet, 2005. **37**(12): p. 1315-6.
100. Amos, C.I., et al., *Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 616-22.
101. Hung, R.J., et al., *A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25*. Nature, 2008. **452**(7187): p. 633-7.
102. Thorgeirsson, T.E., et al., *A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease*. Nature, 2008. **452**(7187): p. 638-42.
103. Lam, D.C., et al., *Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in non-small-cell lung cancer reveals differences between smokers and nonsmokers*. Cancer Res, 2007. **67**(10): p. 4638-47.
104. Slaughter, D.P., H.W. Southwick, and W. Smejkal, *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin*. Cancer, 1953. **6**(5): p. 963-8.
105. Mao, L., et al., *Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(12): p. 857-62.
106. Bartsch, H., et al., *Carcinogen metabolism in human lung tissues and the effect of tobacco smoking: results from a case--control multicenter study on lung cancer patients*. Environ Health Perspect, 1992. **98**: p. 119-24.
107. Califano, J., et al., *Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization*. Cancer Res, 1996. **56**(11): p. 2488-92.

108. Chung, G.T., et al., *Clonal evolution of lung tumors*. Cancer Res, 1996. **56**(7): p. 1609-14.
109. Hilbe, W., et al., *Biomarkers in non-small cell lung cancer prevention*. Eur J Cancer Prev, 2004. **13**(5): p. 425-36.
110. Altmeyer, P. and M. Bacharach-Buhles, *Enzyklopädie der Dermatologie, Venerologie, Allergologie, Umweltmedizin*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010.
111. Sato, M., et al., *A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer*. J Thorac Oncol, 2007. **2**(4): p. 327-43.
112. Hibi, K., et al., *Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer*. Oncogene, 1992. **7**(3): p. 445-9.
113. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
114. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
115. Park, I.W., et al., *Multiple clonal abnormalities in the bronchial epithelium of patients with lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(21): p. 1863-8.
116. Braakhuis, B.J., et al., *A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications*. Cancer Res, 2003. **63**(8): p. 1727-30.
117. Giangreco, A., et al., *Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(23): p. 9286-91.
118. Kim, C.F., et al., *Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer*. Cell, 2005. **121**(6): p. 823-35.
119. Yang, Y., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase mediates bronchioalveolar stem cell expansion in mouse models of oncogenic K-ras-induced lung cancer*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2220.

120. Yanagi, S., et al., *Pten controls lung morphogenesis, bronchioalveolar stem cells, and onset of lung adenocarcinomas in mice*. J Clin Invest, 2007. **117**(10): p. 2929-40.
121. Maley, C.C., et al., *Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma*. Nat Genet, 2006. **38**(4): p. 468-73.
122. Knudson, A.G., *Two genetic hits (more or less) to cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(2): p. 157-62.
123. Loeb, L.A., *A mutator phenotype in cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(8): p. 3230-9.
124. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-3.
125. Myohanen, S.K., S.B. Baylin, and J.G. Herman, *Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia*. Cancer Res, 1998. **58**(4): p. 591-3.
126. Grady, W.M., et al., *Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer*. Nat Genet, 2000. **26**(1): p. 16-7.
127. Girard, L., et al., *Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering*. Cancer Res, 2000. **60**(17): p. 4894-906.
128. Virmani, A.K., et al., *Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types*. Genes Chromosomes Cancer, 1998. **21**(4): p. 308-19.
129. Wistuba, II, et al., *High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 1949-60.
130. Hung, J., et al., *Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma*. JAMA, 1995. **273**(7): p. 558-63.
131. Zochbauer-Muller, S., et al., *5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3581-5.

132. Cooper, D.N., *The molecular genetics of cancer*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2005.
133. Tamura, K., et al., *Deletion of three distinct regions on chromosome 13q in human non-small-cell lung cancer*. Int J Cancer, 1997. **74**(1): p. 45-9.
134. Wistuba, II, L. Mao, and A.F. Gazdar, *Smoking molecular damage in bronchial epithelium*. Oncogene, 2002. **21**(48): p. 7298-306.
135. Ninomiya, H., et al., *Genetic instability in lung cancer: concurrent analysis of chromosomal, mini- and microsatellite instability and loss of heterozygosity*. Br J Cancer, 2006. **94**(10): p. 1485-91.
136. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 220-8.
137. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-92.
138. Kouso, H., et al., *Expression of mismatch repair proteins, hMLH1/hMSH2, in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance*. J Surg Oncol, 2008. **98**(5): p. 377-83.
139. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
140. Deng, G., et al., *Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2002. **86**(4): p. 574-9.
141. Mueller-Klieser, W., *Das Tumormikromilieu*. Nuklearmedizin 2010, 2010(49 (Suppl 1)): p. 16-20.
142. Deshpande, A., P. Sicinski, and P.W. Hinds, *Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2909-15.
143. Witsch, E., M. Sela, and Y. Yarden, *Roles for growth factors in cancer progression*. Physiology (Bethesda), 2010. **25**(2): p. 85-101.

144. Brambilla, C., et al., *Early detection of lung cancer: role of biomarkers*. Eur Respir J Suppl, 2003. **39**: p. 36s-44s.
145. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
146. Sharma, S.V., et al., *Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(3): p. 169-81.
147. Rusch, V., et al., *Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(4): p. 515-22.
148. Sun, S., J.H. Schiller, and A.F. Gazdar, *Lung cancer in never smokers--a different disease*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 778-90.
149. Tang, X., et al., *EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7568-72.
150. Weihua, Z., et al., *Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity*. Cancer Cell, 2008. **13**(5): p. 385-93.
151. Diamandis, E.P., et al., *Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications*. Amer Assn for Clinical Chemistry, 2002.
152. Yatabe, Y., *EGFR mutations and the terminal respiratory unit*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(1): p. 23-36.
153. Yatabe, Y. and T. Mitsudomi, *Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancers*. Pathol Int, 2007. **57**(5): p. 233-44.
154. Gazdar, A.F. and J.D. Minna, *Deregulated EGFR signaling during lung cancer progression: mutations, amplicons, and autocrine loops*. Cancer Prev Res (Phila), 2008. **1**(3): p. 156-60.
155. Shigematsu, H., et al., *Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas*. Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 1642-6.

156. Sasaki, T., et al., *The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer*. Eur J Cancer, 2010. **46**(10): p. 1773-80.
157. Soda, M., et al., *Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 561-6.
158. Soda, M., et al., *A mouse model for EML4-ALK-positive lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 19893-7.
159. West, K.A., et al., *Tobacco carcinogen-induced cellular transformation increases activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway in vitro and in vivo*. Cancer Res, 2004. **64**(2): p. 446-51.
160. Sos, M.L., et al., *PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3256-61.
161. Mitsudomi, T. and Y. Yatabe, *Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer*. Cancer Sci, 2007. **98**(12): p. 1817-24.
162. Nakata, S., et al., *The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance*. Cancer, 2006. **106**(10): p. 2190-9.
163. Gu, J., et al., *Aberrant promoter methylation profile and association with survival in patients with non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(24): p. 7329-38.
164. de Mello, R.A., et al., *Epidermal growth factor receptor and K-Ras in non-small cell lung cancer-molecular pathways involved and targeted therapies*. World J Clin Oncol, 2011. **2**(11): p. 367-76.
165. Gaughan, E.M. and D.B. Costa, *Genotype-driven therapies for non-small cell lung cancer: focus on EGFR, KRAS and ALK gene abnormalities*. Ther Adv Med Oncol, 2011. **3**(3): p. 113-25.
166. Sherr, C.J. and F. McCormick, *The RB and p53 pathways in cancer*. Cancer Cell, 2002. **2**(2): p. 103-12.

167. Ikushima, H. and K. Miyazono, *TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(6): p. 415-24.
168. Bierie, B. and H.L. Moses, *Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(7): p. 506-20.
169. Saito, R.A., et al., *Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 2783-91.
170. Tan, D., et al., *Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer: a high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study*. Hum Pathol, 2003. **34**(6): p. 597-604.
171. Heller, G., C.C. Zielinski, and S. Zochbauer-Muller, *Lung cancer: from single-gene methylation to methylome profiling*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(1): p. 95-107.
172. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene, 2007. **26**(9): p. 1324-37.
173. Lowe, S.W., E. Cepero, and G. Evan, *Intrinsic tumour suppression*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 307-15.
174. Junttila, M.R. and G.I. Evan, *p53--a Jack of all trades but master of none*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(11): p. 821-9.
175. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. Cell, 2008. **132**(1): p. 27-42.
176. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2861-73.
177. Zong, W.X. and C.B. Thompson, *Necrotic death as a cell fate*. Genes Dev, 2006. **20**(1): p. 1-15.
178. Galluzzi, L. and G. Kroemer, *Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis*. Cell, 2008. **135**(7): p. 1161-3.

179. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
180. Pavelic, J., et al., *The consequences of insulin-like growth factors/receptors dysfunction in lung cancer*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(1): p. 65-71.
181. Cappuzzo, F., et al., *Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) expression and survival in surgically resected non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients*. Ann Oncol, 2010. **21**(3): p. 562-7.
182. Blasco, M.A., *Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): p. 611-22.
183. Masutomi, K., et al., *The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8222-7.
184. Kang, H.J., et al., *Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase protects against brain injury resulting from ischemia and NMDA-induced neurotoxicity*. J Neurosci, 2004. **24**(6): p. 1280-7.
185. Catarino, R., et al., *Prognostic significance of telomerase polymorphism in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(14): p. 3706-12.
186. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
187. Raza, A., M.J. Franklin, and A.Z. Dudek, *Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis*. Am J Hematol, 2010. **85**(8): p. 593-8.
188. Bergers, G. and S. Song, *The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance*. Neuro Oncol, 2005. **7**(4): p. 452-64.
189. Zumsteg, A. and G. Christofori, *Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis*. Curr Opin Oncol, 2009. **21**(1): p. 60-70.
190. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.

191. Murdoch, C., et al., *The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(8): p. 618-31.
192. Baeriswyl, V. and G. Christofori, *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(5): p. 329-37.
193. Kazerounian, S., K.O. Yee, and J. Lawler, *Thrombospondins in cancer*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(5): p. 700-12.
194. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 401-10.
195. Potter, V.R., *The biochemical approach to the cancer problem*. Fed Proc, 1958. **17**(2): p. 691-7.
196. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
197. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 11-20.
198. Jones, R.G. and C.B. Thompson, *Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth*. Genes Dev, 2009. **23**(5): p. 537-48.
199. O'Byrne, K.J., et al., *Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer*. Br J Cancer, 2000. **82**(8): p. 1427-32.
200. Fontanini, G., et al., *Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma*. Eur J Cancer, 1998. **34**(5): p. 718-23.
201. Merrick, D.T., et al., *Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis*. Lung Cancer, 2005. **48**(1): p. 31-45.
202. Bissett, D., et al., *Phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat in non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(4): p. 842-9.

203. Yamaguchi, M., et al., *Reduced expression of thrombospondin-1 correlates with a poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2002. **36**(2): p. 143-50.
204. Younes, M., et al., *Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival*. Cancer, 1997. **80**(6): p. 1046-51.
205. Klymkowsky, M.W. and P. Savagner, *Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe*. Am J Pathol, 2009. **174**(5): p. 1588-93.
206. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
207. Yilmaz, M. and G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 15-33.
208. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
209. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5649-69.
210. McGowan, P.M., J.M. Kirstein, and A.F. Chambers, *Micrometastatic disease and metastatic outgrowth: clinical issues and experimental approaches*. Future Oncol, 2009. **5**(7): p. 1083-98.
211. Berx, G. and F. van Roy, *Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a003129.
212. Cavallaro, U. and G. Christofori, *Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 118-32.
213. Yamauchi, M., et al., *N-cadherin expression is a potential survival mechanism of gefitinib-resistant lung cancer cells*. Am J Cancer Res, 2011. **1**(7): p. 823-33.
214. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.

215. Du, L. and A. Pertsemlidis, *microRNAs and lung cancer: tumors and 22-mers*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(1): p. 109-22.
216. Eulalio, A., E. Huntzinger, and E. Izaurralde, *Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing*. Cell, 2008. **132**(1): p. 9-14.
217. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-66.
218. Farazi, T.A., et al., *miRNAs in human cancer*. J Pathol, 2011. **223**(2): p. 102-15.
219. Yanaihara, N., et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 189-98.
220. Melo, S.A. and M. Esteller, *A precursor microRNA in a cancer cell nucleus: get me out of here!* Cell Cycle, 2011. **10**(6): p. 922-5.
221. Fabbri, M., et al., *MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15805-10.
222. Brueckner, B., et al., *The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function*. Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1419-23.
223. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell, 2005. **120**(5): p. 635-47.
224. Takamizawa, J., et al., *Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3753-6.
225. Hermeking, H., *The miR-34 family in cancer and apoptosis*. Cell Death Differ, 2010. **17**(2): p. 193-9.
226. Gallardo, E., et al., *miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer*. Carcinogenesis, 2009. **30**(11): p. 1903-9.
227. Wang, X.C., et al., *The expression and function of miRNA-451 in non-small cell lung cancer*. Cancer Lett, 2011. **311**(2): p. 203-9.

228. Yu, S.L., et al., *MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 48-57.
229. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
230. Weiss, G.J., et al., *EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines*. Ann Oncol, 2008. **19**(6): p. 1053-9.
231. Markou, A., et al., *Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR*. Clin Chem, 2008. **54**(10): p. 1696-704.
232. Zhang, J.G., et al., *MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC)*. Clin Chim Acta, 2010. **411**(11-12): p. 846-52.
233. Garofalo, M., et al., *miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation*. Cancer Cell, 2009. **16**(6): p. 498-509.
234. Kunkel, T.A., *The high cost of living. American Association for Cancer Research Special Conference: endogenous sources of mutations, Fort Myers, Florida, USA, 11-15 November 1998*. Trends Genet, 1999. **15**(3): p. 93-4.
235. Sidransky, D. and M. Hollstein, *Clinical implications of the p53 gene*. Annu Rev Med, 1996. **47**: p. 285-301.
236. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
237. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1071-8.
238. Ciccia, A. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: making it safe to play with knives*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 179-204.
239. Kastan, M.B., *DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(4): p. 517-24.

240. Hickman, E.S., M.C. Moroni, and K. Helin, *The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 60-6.
241. Hussain, S.P. and C.C. Harris, *Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes*. Cancer Res, 1998. **58**(18): p. 4023-37.
242. Pegg, A.E., M.E. Dolan, and R.C. Moschel, *Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1995. **51**: p. 167-223.
243. Lo, Y.L., et al., *Polymorphisms of MLH1 and MSH2 genes and the risk of lung cancer among never smokers*. Lung Cancer, 2011. **72**(3): p. 280-6.
244. Marian, B. (Hrsg.), *Krankheit, Krankheitsursachen und -bilder, MCW-Block 8*. facultas.wuv, 3. Aufl., 2009.
245. Nicholl, I.D., K. Nealon, and M.K. Kenny, *Reconstitution of human base excision repair with purified proteins*. Biochemistry, 1997. **36**(24): p. 7557-66.
246. Kubota, Y., et al., *Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein*. EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6662-70.
247. Tang, M.S., et al., *Differences and similarities in the repair of two benzo[a]pyrene diol epoxide isomers induced DNA adducts by uvrA, uvrB, and uvrC gene products*. Biochemistry, 1992. **31**(36): p. 8429-36.
248. Braithwaite, E., X. Wu, and Z. Wang, *Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro*. Carcinogenesis, 1998. **19**(7): p. 1239-46.
249. Wood, R.D., *Nucleotide excision repair in mammalian cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23465-8.
250. Wu, X., et al., *XPA polymorphism associated with reduced lung cancer risk and a modulating effect on nucleotide excision repair capacity*. Carcinogenesis, 2003. **24**(3): p. 505-9.

251. Yu, D., et al., *Characterization of functional excision repair cross-complementation group 1 variants and their association with lung cancer risk and prognosis*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(9): p. 2878-86.
252. Zheng, Z., et al., *DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer*. N Engl J Med, 2007. **356**(8): p. 800-8.
253. Friedberg, E.C., G.C. Walker, and W. Siede, *DNA repair and Mutagenesis*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC., 1995.
254. Qian, B., et al., *Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk*. Lung Cancer, 2011. **73**(2): p. 138-46.
255. Kriaucionis, S. and N. Heintz, *The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain*. Science, 2009. **324**(5929): p. 929-30.
256. Williams, K., et al., *TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 343-8.
257. Ficiz, G., et al., *Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 398-402.
258. Sharma, S.V., et al., *A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations*. Cell, 2010. **141**(1): p. 69-80.
259. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. **324**(5929): p. 930-5.
260. Wistuba, II, et al., *Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(18): p. 1366-73.
261. Russo, V.E.A., R.A. Martienssen, and A.D. Riggs, *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1996.
262. Portela, A. and Esteller, M., *Epigenetic modifications and human disease*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(10): p. 1057-68.
263. Illingworth, R.S. and A.P. Bird, *CpG islands--'a rough guide'*. FEBS Lett, 2009. **583**(11): p. 1713-20.

264. Jones, P.A. and D. Takai, *The role of DNA methylation in mammalian epigenetics*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1068-70.
265. Esteller, M., *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(4): p. 286-98.
266. Fraga, M.F., et al., *Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(30): p. 10604-9.
267. Bird, A.P. and Wolffe, A.P., *Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin*. Cell, 1999. **99**(5): p. 451-4.
268. Baylin, S.B., et al., *Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 687-92.
269. Esteller, M., *Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 629-56.
270. Allis, C.D., T. Jenuwein, and D. Reinberg, *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2007.
271. Baylin, S.B., et al., *Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia*. Adv Cancer Res, 1998. **72**: p. 141-96.
272. Fuks, F., et al., *DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity*. Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 88-91.
273. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
274. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 219-20.
275. Robertson, K.D., et al., *The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(11): p. 2291-8.
276. Bestor, T.H., *Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain*. EMBO J, 1992. **11**(7): p. 2611-7.

277. Pradhan, S., et al., *Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation.* J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33002-10.
278. Robert, M.F., et al., *DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells.* Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 61-5.
279. Leonhardt, H., et al., *A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei.* Cell, 1992. **71**(5): p. 865-73.
280. Chuang, L.S., et al., *Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1.* Science, 1997. **277**(5334): p. 1996-2000.
281. Yoder, J.A., et al., *DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe.* J Mol Biol, 1997. **270**(3): p. 385-95.
282. Schermelleh, L., et al., *Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation.* Nucleic Acids Res, 2007. **35**(13): p. 4301-12.
283. Arita, K., et al., *Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism.* Nature, 2008. **455**(7214): p. 818-21.
284. Hashimoto, H., et al., *The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix.* Nature, 2008. **455**(7214): p. 826-9.
285. Pradhan, M., et al., *CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity.* Biochemistry, 2008. **47**(38): p. 10000-9.
286. Magewu, A.N. and P.A. Jones, *Ubiquitous and tenacious methylation of the CpG site in codon 248 of the p53 gene may explain its frequent appearance as a mutational hot spot in human cancer.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(6): p. 4225-32.
287. Turker, M.S., *The establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse somatic cells.* Semin Cancer Biol, 1999. **9**(5): p. 329-37.
288. Christman, J.K., et al., *5-Methyl-2'-deoxycytidine in single-stranded DNA can act in cis to signal de novo DNA methylation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7347-51.

289. Carotti, D., et al., *Influence of pre-existing methylation on the de novo activity of eukaryotic DNA methyltransferase*. Biochemistry, 1998. **37**(4): p. 1101-8.
290. Fatemi, M., et al., *The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA*. J Mol Biol, 2001. **309**(5): p. 1189-99.
291. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
292. Robertson, K.D. and A.P. Wolffe, *DNA methylation in health and disease*. Nat Rev Genet, 2000. **1**(1): p. 11-9.
293. Rhee, I., et al., *CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1*. Nature, 2000. **404**(6781): p. 1003-7.
294. Suetake, I., et al., *DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27816-23.
295. Kareta, M.S., et al., *Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 25893-902.
296. Ooi, S.K., et al., *DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA*. Nature, 2007. **448**(7154): p. 714-7.
297. Rhee, I., et al., *DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 552-6.
298. Issa, J.P., et al., *Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon*. Nat Genet, 1994. **7**(4): p. 536-40.
299. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*. Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 335-40.
300. Colot, V. and J.L. Rossignol, *Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device*. Bioessays, 1999. **21**(5): p. 402-11.

301. Takai, D. and P.A. Jones, *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3740-5.
302. Esteller, M., *Epigenetics in evolution and disease*. Lancet, 2008. **372**: p. 90-96.
303. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
304. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
305. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. Nature, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
306. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. J Mol Biol, 1987. **196**(2): p. 261-82.
307. Tazi, J. and A. Bird, *Alternative chromatin structure at CpG islands*. Cell, 1990. **60**(6): p. 909-20.
308. Razin, A. and H. Cedar, *DNA methylation and genomic imprinting*. Cell, 1994. **77**(4): p. 473-6.
309. Straussman, R., et al., *Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(5): p. 564-71.
310. Saxonov, S., P. Berg, and D.L. Brutlag, *A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1412-7.
311. Illingworth, R.S., et al., *Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome*. PLoS Genet, 2010. **6**(9).
312. Maunakea, A.K., et al., *Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters*. Nature, 2010. **466**(7303): p. 253-7.
313. Costello, J.F., et al., *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. Nat Genet, 2000. **24**(2): p. 132-8.

314. Klose, R.J. and A.P. Bird, *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(2): p. 89-97.
315. Bogdanovic, O. and G.J. Veenstra, *DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function*. Chromosoma, 2009. **118**(5): p. 549-65.
316. Esteller, M., *Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome*. Hum Mol Genet, 2007. **16 Spec No 1**: p. R50-9.
317. Jones, P.L., et al., *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 187-91.
318. Lopez-Serra, L. and M. Esteller, *Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words*. Br J Cancer, 2008. **98**(12): p. 1881-5.
319. Miremadi, A., et al., *Cancer genetics of epigenetic genes*. Hum Mol Genet, 2007. **16 Spec No 1**: p. R28-49.
320. Sarraf, S.A. and I. Stancheva, *Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 595-605.
321. Wang, H., et al., *mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression*. Mol Cell, 2003. **12**(2): p. 475-87.
322. Zhang, Y., et al., *Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation*. Genes Dev, 1999. **13**(15): p. 1924-35.
323. Xue, Y., et al., *NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities*. Mol Cell, 1998. **2**(6): p. 851-61.
324. Hendrich, B., et al., *The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites*. Nature, 1999. **401**(6750): p. 301-4.
325. Millar, C.B., et al., *Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice*. Science, 2002. **297**(5580): p. 403-5.

326. Kondo, E., et al., *The thymine DNA glycosylase MBD4 represses transcription and is associated with methylated p16(INK4a) and hMLH1 genes*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(11): p. 4388-96.
327. Wakefield, R.I., et al., *The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA*. J Mol Biol, 1999. **291**(5): p. 1055-65.
328. Nan, X., F.J. Campoy, and A. Bird, *MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin*. Cell, 1997. **88**(4): p. 471-81.
329. Kaludov, N.K. and A.P. Wolffe, *MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(9): p. 1921-8.
330. Prokhortchouk, A., et al., *The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor*. Genes Dev, 2001. **15**(13): p. 1613-8.
331. Yoon, H.G., et al., *N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 723-34.
332. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
333. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
334. Allis, C.D., et al., *New nomenclature for chromatin-modifying enzymes*. Cell, 2007. **131**(4): p. 633-6.
335. Mack, G.S., *Epigenetic cancer therapy makes headway*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(20): p. 1443-4.
336. Bernstein, B.E., A. Meissner, and E.S. Lander, *The mammalian epigenome*. Cell, 2007. **128**(4): p. 669-81.
337. Bannister, A.J., et al., *Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 120-4.

338. Noma, K., C.D. Allis, and S.I. Grewal, *Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1150-5.
339. Nakayama, J., et al., *Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly*. Science, 2001. **292**(5514): p. 110-3.
340. Zhang, Y. and D. Reinberg, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. Genes Dev, 2001. **15**(18): p. 2343-60.
341. Lin, J.C., et al., *Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island*. Cancer Cell, 2007. **12**(5): p. 432-44.
342. Rosenfeld, J.A., et al., *Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 143.
343. Li, B., M. Carey, and J.L. Workman, *The role of chromatin during transcription*. Cell, 2007. **128**(4): p. 707-19.
344. Fraga, M.F., et al., *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer*. Nat Genet, 2005. **37**(4): p. 391-400.
345. Gibbons, R.J., *Histone modifying and chromatin remodelling enzymes in cancer and dysplastic syndromes*. Hum Mol Genet, 2005. **14 Spec No 1**: p. R85-92.
346. Ng, H.H. and A. Bird, *DNA methylation and chromatin modification*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(2): p. 158-63.
347. Harikrishnan, K.N., et al., *Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing*. Nat Genet, 2005. **37**(3): p. 254-64.
348. Lee, D., et al., *SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22330-7.
349. Oh, J., et al., *BAF60a interacts with p53 to recruit the SWI/SNF complex*. J Biol Chem, 2008. **283**(18): p. 11924-34.

350. Reisman, D., S. Glaros, and E.A. Thompson, *The SWI/SNF complex and cancer*. Oncogene, 2009. **28**(14): p. 1653-68.
351. Xu, Y., W. Yan, and X. Chen, *SNF5, a core component of the SWI/SNF complex, is necessary for p53 expression and cell survival, in part through eIF4E*. Oncogene, 2010. **29**(28): p. 4090-100.
352. Fujimura, Y., et al., *Distinct roles of Polycomb group gene products in transcriptionally repressed and active domains of Hoxb8*. Development, 2006. **133**(12): p. 2371-81.
353. Ringrose, L. and R. Paro, *Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins*. Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 413-43.
354. Crea, F., et al., *Polycomb genes and cancer: Time for clinical application?* Crit Rev Oncol Hematol, 2011.
355. Esteller, M. and J.G. Herman, *Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours*. The Journal of Pathology, 2001. **196**(1): p. 1-7.
356. Goelz, S.E., et al., *Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms*. Science, 1985. **228**(4696): p. 187-90.
357. Gaudet, F., et al., *Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation*. Science, 2003. **300**(5618): p. 489-92.
358. Wilson, A.S., B.E. Power, and P.L. Molloy, *DNA hypomethylation and human diseases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1775**(1): p. 138-62.
359. Ito, Y., et al., *Somatically acquired hypomethylation of IGF2 in breast and colorectal cancer*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(17): p. 2633-43.
360. Vu, T.H., A.H. Nguyen, and A.R. Hoffman, *Loss of IGF2 imprinting is associated with abrogation of long-range intrachromosomal interactions in human cancer cells*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(5): p. 901-19.

361. Baylin, S.B., S.A. Belinsky, and J.G. Herman, *Aberrant methylation of gene promoters in cancer---concepts, misconcepts, and promise*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(18): p. 1460-1.
362. Esteller, M., et al., *DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(26): p. 3001-7.
363. Toyooka, S., et al., *Molecular oncology of lung cancer*. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2011. **59**(8): p. 527-37.
364. Deaton, A.M. and A. Bird, *CpG islands and the regulation of transcription*. Genes Dev, 2011. **25**(10): p. 1010-22.
365. Borczuk, A.C., et al., *Non-small-cell lung cancer molecular signatures recapitulate lung developmental pathways*. Am J Pathol, 2003. **163**(5): p. 1949-60.
366. Naxerova, K., et al., *Analysis of gene expression in a developmental context emphasizes distinct biological leitmotifs in human cancers*. Genome Biol, 2008. **9**(7): p. R108.
367. Liu, H., et al., *Predicting survival within the lung cancer histopathological hierarchy using a multi-scale genomic model of development*. PLoS Med, 2006. **3**(7): p. e232.
368. Helman, E., K. Naxerova, and I.S. Kohane, *DNA hypermethylation in lung cancer is targeted at differentiation-associated genes*. Oncogene, 2011.
369. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis*. Cancer Res, 2000. **60**(9): p. 2368-71.
370. Ekim, M., et al., *Determination of O-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation in non-small cell lung cancer*. Genet Test Mol Biomarkers, 2011. **15**(5): p. 357-60.
371. Esteller, M., et al., *Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4689-92.

372. Xu, X.C., et al., *Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(9): p. 624-9.
373. Zochbauer-Muller, S., et al., *Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers*. Cancer Res, 2001. **61**(1): p. 249-55.
374. Kuramochi, M., et al., *TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer*. Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 427-30.
375. Kikuchi, S., et al., *Promoter methylation of DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(8): p. 2954-61.
376. Zochbauer-Muller, S., et al., *Expression of the candidate tumor suppressor gene hSRBC is frequently lost in primary lung cancers with and without DNA methylation*. Oncogene, 2005. **24**(41): p. 6249-55.
377. Yeivin, A. and A. Razin, *Gene methylation patterns and expression*. EXS, 1993. **64**: p. 523-68.
378. Esteller, M., et al., *A gene hypermethylation profile of human cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(8): p. 3225-9.
379. Yanagawa, N., et al., *Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers*. Cancer Sci, 2003. **94**(7): p. 589-92.
380. Ehrich, M., et al., *Cytosine methylation profiles as a molecular marker in non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(22): p. 10911-8.
381. Toyooka, S., et al., *DNA methylation profiles of lung tumors*. Mol Cancer Ther, 2001. **1**(1): p. 61-7.
382. Toyooka, S., et al., *Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer*. Int J Cancer, 2003. **103**(2): p. 153-60.
383. Hawes, S.E., et al., *DNA hypermethylation of tumors from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients is associated with gender and histologic type*. Lung Cancer, 2010. **69**(2): p. 172-9.

384. Schabath, M.B., et al., *Hormone replacement therapy and lung cancer risk: a case-control analysis*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(1 Pt 1): p. 113-23.
385. Ganti, A.K., et al., *Hormone replacement therapy is associated with decreased survival in women with lung cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(1): p. 59-63.
386. Wei, Q., et al., *Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(21): p. 1764-72.
387. Toyooka, S., et al., *Mutational and epigenetic evidence for independent pathways for lung adenocarcinomas arising in smokers and never smokers*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1371-5.
388. Guo, M., et al., *Promoter hypermethylation of resected bronchial margins: a field defect of changes?* Clin Cancer Res, 2004. **10**(15): p. 5131-6.
389. Laird, P.W., *The power and the promise of DNA methylation markers*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(4): p. 253-66.
390. Baylin, S.B. and P.A. Jones, *A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(10): p. 726-34.
391. Palmisano, W.A., et al., *Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum*. Cancer Res, 2000. **60**(21): p. 5954-8.
392. Esteller, M., et al., *Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients*. Cancer Res, 1999. **59**(1): p. 67-70.
393. Belinsky, S.A., et al., *Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11891-6.
394. Toyooka, S., et al., *The relationship between aberrant methylation and survival in non-small-cell lung cancers*. Br J Cancer, 2004. **91**(4): p. 771-4.
395. Belinsky, S.A., et al., *Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3338-44.

396. Brock, M.V., et al., *DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1118-28.
397. Kim, J.S., et al., *Cohypermethylation of p16 and FHIT promoters as a prognostic factor of recurrence in surgically resected stage I non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 4049-54.
398. Nana-Sinkam, S.P., M. Fabbri, and C.M. Croce, *MicroRNAs in cancer: personalizing diagnosis and therapy*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1210**: p. 25-33.
399. Field, J.K., et al., *Consensus statements from the Second International Lung Cancer Molecular Biomarkers Workshop: a European strategy for developing lung cancer molecular diagnostics in high risk populations*. Int J Oncol, 2002. **21**(2): p. 369-73.
400. Agger, K., et al., *The emerging functions of histone demethylases*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(2): p. 159-68.
401. Issa, J.P., *DNA methylation as a therapeutic target in cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(6): p. 1634-7.
402. Tang, Y.A., et al., *A novel histone deacetylase inhibitor exhibits antitumor activity via apoptosis induction, F-actin disruption and gene acetylation in lung cancer*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12417.
403. Yoon, B.S., et al., *Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment*. Differentiation, 2006. **74**(4): p. 149-59.
404. Banerjee, S. and M. Bacanamwo, *DNA methyltransferase inhibition induces mouse embryonic stem cell differentiation into endothelial cells*. Exp Cell Res, 2010. **316**(2): p. 172-80.
405. Cameron, E.E., et al., *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer*. Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 103-7.
406. Belinsky, S.A., et al., *Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7089-93.

407. Marks, P., et al., *Histone deacetylases and cancer: causes and therapies*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 194-202.
408. Minucci, S. and P.G. Pelicci, *Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 38-51.
409. Santi, D.V., C.E. Garrett, and P.J. Barr, *On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs*. Cell, 1983. **33**(1): p. 9-10.
410. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
411. Goffin, J. and E. Eisenhauer, *DNA methyltransferase inhibitors-state of the art*. Ann Oncol, 2002. **13**(11): p. 1699-716.
412. Komatsu, N., et al., *SAHA, a HDAC inhibitor, has profound anti-growth activity against non-small cell lung cancer cells*. Oncol Rep, 2006. **15**(1): p. 187-91.
413. Yoshida, M. and S. Horinouchi, *Trichostatin and leptomycin. Inhibition of histone deacetylation and signal-dependent nuclear export*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **886**: p. 23-36.
414. Zochbauer-Muller, S., J.D. Minna, and A.F. Gazdar, *Aberrant DNA methylation in lung cancer: biological and clinical implications*. Oncologist, 2002. **7**(5): p. 451-7.
415. Zochbauer-Muller, S., et al., *Aberrant methylation of multiple genes in the upper aerodigestive tract epithelium of heavy smokers*. Int J Cancer, 2003. **107**(4): p. 612-6.
416. Heller, G., et al., *Expression and methylation pattern of TSLC1 cascade genes in lung carcinomas*. Oncogene, 2006. **25**(6): p. 959-68.
417. Heller, G., et al., *Genome-Wide miRNA Expression Profiling Identifies miR-9-3 and miR-193a as Targets for DNA Methylation in Non-Small Cell Lung Cancers*. Clin Cancer Res, 2012.
418. Weber, M., et al., *Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells*. Nat Genet, 2005. **37**(8): p. 853-62.

419. Dallosso, A.R., et al., *Frequent long-range epigenetic silencing of protocadherin gene clusters on chromosome 5q31 in Wilms' tumor*. PLoS Genet, 2009. **5**(11): p. e1000745.
420. Heller, G., et al., *Genome-wide CpG island methylation analyses in non-small cell lung cancer patients*. Eingereicht.
421. Rauch, T., et al., *Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5527-32.
422. Kuzmin, A., et al., *The PcG gene Sfbmt2 is paternally expressed in extraembryonic tissues*. Gene Expr Patterns, 2008. **8**(2): p. 107-16.
423. Bennett, L.B., et al., *DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2009. **48**(9): p. 828-41.
424. Hoffman, P.C., A.M. Mauer, and E.E. Vokes, *Lung cancer*. Lancet, 2000. **355**(9202): p. 479-85.
425. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989. **2nd ed**.
426. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1827-31.
427. Herman, J.G., et al., *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9821-6.
428. Lottspeich, F. and J. Engels, *Bioanalytik*. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München, 2006(2. Aufl.).
429. Wrba, F., H. Dolznig, and C. Mannhalter, *Genetik verstehen*. Grundlagen der molekularen Biologie, 2011. **2. Aufl.**(facultas.wuv, Wien).

430. Wojdacz, T.K. and A. Dobrovic, *Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(6): p. e41.
431. Wojdacz, T.K., A. Dobrovic, and L.L. Hansen, *Methylation-sensitive high-resolution melting*. Nat Protoc, 2008. **3**(12): p. 1903-8.
432. <http://www.biocompare.com/Articles/ApplicationNote/1857/A-Practical-Guide-to-High-Resolution-Melt-Analysis-Genotyping.html>, (Stand: 24.03.2012).
433. Qiagen, <http://www.qiagen.com/products/rotor-geneq.aspx>, (Stand: 24.03.2012).
434. T.A., B., *Gentechnologie für Einsteiger*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 6. Aufl., 2011.
435. Invitrogen, http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr4topo_map.pdf (Stand: 20.03.2012).
436. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
437. <http://news.thomasnet.com/fullstory/Membrane-Sandwiches-make-western-blotting-easier-13151> (Stand: 01.04.2012).
438. Walter, K., et al., *DNA methylation profiling defines clinically relevant biological subsets of non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(8): p. 2360-73.
439. Dai, Z., et al., *Global methylation profiling of lung cancer identifies novel methylated genes*. Neoplasia, 2001. **3**(4): p. 314-23.
440. Shames, D.S., et al., *A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies*. PLoS Med, 2006. **3**(12): p. e486.
441. Zhong, S., et al., *Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer*. Oncogene, 2007. **26**(18): p. 2621-34.

442. Bestor, T.H., *Unanswered questions about the role of promoter methylation in carcinogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **983**: p. 22-7.
443. Sato, N., et al., *Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays*. Cancer Res, 2003. **63**(13): p. 3735-42.
444. Christensen, B.C., et al., *Differentiation of lung adenocarcinoma, pleural mesothelioma, and nonmalignant pulmonary tissues using DNA methylation profiles*. Cancer Res, 2009. **69**(15): p. 6315-21.
445. Bibikova, M., et al., *High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays*. Genome Res, 2006. **16**(3): p. 383-93.
446. Sandoval, J., et al., *Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome*. Epigenetics, 2011. **6**(6): p. 692-702.
447. Wojdacz, T.K., *Methylation-sensitive high-resolution melting in the context of legislative requirements for validation of analytical procedures for diagnostic applications*. Expert Rev Mol Diagn, 2012. **12**(1): p. 39-47.
448. Mao, L., et al., *Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer*. Cancer Res, 1994. **54**(7): p. 1634-7.
449. Brabender, J., et al., *Quantitative O(6)-methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(1): p. 223-7.
450. Rauch, T.A., et al., *High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(1): p. 252-7.
451. Belinsky, S.A., *Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(9): p. 707-17.
452. Majewski, I.J. and R. Bernards, *Taming the dragon: genomic biomarkers to individualize the treatment of cancer*. Nat Med, 2011. **17**(3): p. 304-12.
453. Bonomi, M., et al., *Adjuvant chemotherapy for resected non-small-cell lung cancer: future perspectives for clinical research*. J Exp Clin Cancer Res, 2011. **30**: p. 115.

454. Tang, X., et al., *Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(18): p. 1511-6.
455. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1350-4.
456. Toyota, M., et al., *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8681-6.
457. Azzoli, C.G., et al., *Molecularly tailored adjuvant chemotherapy for resected non-small cell lung cancer: a time for excitement and equipoise*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(1): p. 84-93.
458. Bailey, V.J., et al., *MS-qFRET: a quantum dot-based method for analysis of DNA methylation*. Genome Res, 2009. **19**(8): p. 1455-61.
459. Li, M., et al., *Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(9): p. 858-63.
460. Redmond, K.M., et al., *Resistance mechanisms to cancer chemotherapy*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 5138-54.
461. Kurata, T., et al., *Effect of re-treatment with gefitinib ('Iressa', ZD1839) after acquisition of resistance*. Ann Oncol, 2004. **15**(1): p. 173-4.
462. Yano, S., et al., *Retreatment of lung adenocarcinoma patients with gefitinib who had experienced favorable results from their initial treatment with this selective epidermal growth factor receptor inhibitor: a report of three cases*. Oncol Res, 2005. **15**(2): p. 107-11.
463. Glasspool, R.M., J.M. Teodoridis, and R. Brown, *Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance*. Br J Cancer, 2006. **94**(8): p. 1087-92.
464. Uramoto, H., et al., *Expression of selected gene for acquired drug resistance to EGFR-TKI in lung adenocarcinoma*. Lung Cancer, 2011. **73**(3): p. 361-5.
465. Kelly, T.K., D.D. De Carvalho, and P.A. Jones, *Epigenetic modifications as therapeutic targets*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(10): p. 1069-1078.

466. Liang, G., et al., *Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine*. Cancer Res, 2002. **62**(4): p. 961-6.
467. Suzuki, H., et al., *A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer*. Nat Genet, 2002. **31**(2): p. 141-9.
468. Soengas, M.S., et al., *Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 207-11.
469. Bender, C.M., et al., *Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 6690-8.
470. Juergens, R., et al., *A phase II-trial of 5-azacytidine (5AC) and entinostat (SNDX-275) in relapsed advanced lung cancer (NSCLC): an interim analysis*. Abstract# A6.6, 13th World Conference on Lung Cancer (WCLC), 2009.
471. Ramalingam, S.S., et al., *Carboplatin and Paclitaxel in combination with either vorinostat or placebo for first-line therapy of advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(1): p. 56-62.
472. Owonikoko, T.K., et al., *Vorinostat increases carboplatin and paclitaxel activity in non-small-cell lung cancer cells*. Int J Cancer, 2010. **126**(3): p. 743-55.
473. Boumber, Y. and J.P. Issa, *Epigenetics in cancer: what's the future?* Oncology (Williston Park), 2011. **25**(3): p. 220-6, 228.
474. Fojo, T. and C. Grady, *How much is life worth: cetuximab, non-small cell lung cancer, and the \$440 billion question*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(15): p. 1044-8.

CURRICULUM VITAE



Name: Marlene Maria Gertraud Weinzierl

Geburtsdaten, Staatsbürgerschaft: Gnas/Steiermark, 21.07.1981, Österreich

Mutter: Maria Kranawetter, gelernte Einzelhandelskauffrau, Hausfrau

Vater: Josef Gütl, Landmaschinenmechaniker

Wohnsitz: 8343 Trautmannsdorf 212; Schöffelgasse 16/10, 1180 Wien

Kontakt: 0680/133 04 06, marlene_weinzierl@web.de

AUSBILDUNG

- **UNIVERSITÄT WIEN:**
10/2002 – 06/2012: **Diplomstudium Biologie**,
Studienzweig **Anthropologie** mit Fachvertiefung Humangenetik

10/2004 – 06/2006 Interessenstudium **Sprachwissenschaft**
- 09/1995 – 07/2000: **Bundeshandelsakademie** Feldbach/Steiermark
- 09/1991 – 07/1995: **Hauptschule** Bad Gleichenberg/Steiermark
- 09/1987 – 09/1991: **Volksschule** Trautmannsdorf/Steiermark

BERUFSERFAHRUNG

seit 11/2011:

AGO - Akademischer Gästediens in Österreich GmbH, 1040 Wien:

Zeitarbeiterin, Teilzeit, diverse Tätigkeiten

www.ago.at

05/2010 – 05/2011:

Medizinische Universität Wien, Klin. Abt. f. Onkologie, Univ.Klinik f. Innere Med. I,
Bereich Epigenetik, 1090 Wien: **Diplomandin**, Vollzeit

Thema: DNA-Methylierung als epigenetischer Regulator von fünf Genen beim nicht-kleinzelligen
Lungenkarzinom (NSCLC) www.onkologie-wien.at/forschung-und-lehre/forschungsschwerpunkte/epigenetik/

07/2004 – 02/2010:

Cinepromotion & Filmmarketing GmbH, 1070 Wien: **Sachbearbeiterin**, Teilzeit

Kundenservice per E-Mail & Telefon, Betreuung der Nutzerdaten, Beschwerde-Management,
Website-Testung www.cinepromotion.at, www.cineplexx.at

01/2007 – 01/2010:

viennAventura, Sprach-/Kreativinstitut, 1060 Wien: **freie Mitarbeiterin**

Produkttests, Verfassen von Texten, diverses

www.viennaventura.at

01/2002 – 05/2004:

Österreichische Post AG, 1010 Wien: **freie Mitarbeiterin** Datenerfassung www.post.at

08/2000 – 09/2001:

Frauenzeitschrift MAXIMA, 2355 Wr. Neudorf: **Redaktionsassistentin**, Vollzeit
allgemeine Büro- und Redaktionstätigkeiten, Betreuung von Kurzseiten, Briefing der
GrafikerIn

www.maxima.co.at, www.rewe.at

LABORKENNTNISSE

- PCR, Isolierung von Nukleinsäuren und Proteinen, Western Blotting, Zellkultur, Primerdesign, Bisulfit-Behandlung genomischer DNA, methylierungsspezifische high-resolution-melting analysis (MS-HRM), Klonierung/Transformation
- diverse Praktika und universitäre Übungen:
qPCR, SNP-Analyse, FISH, ELISA, Southern Blotting, Sequenzierung, osteologische Untersuchungen (makroskopisch)

SONSTIGE KOMPETENZEN

- sehr gute EDV-Kenntnisse: MS Office 95-2007 + Internet (Anwender)
- sehr gutes schriftliches Ausdrucksvermögen
- ausgezeichnete Rechtschreib- und Maschinschreibkenntnisse
- Präsentationstechniken

SPRACHEN

Deutsch: Muttersprache
Englisch: sehr gut
Französisch: Schulkenntnisse
Latein: Schulkenntnisse

HOBBIES

Lesen
Musik

SONSTIGES

Nichtraucherin, Führerschein B seit 1999

PUBLIKATIONEN:

Heller G, **Weinzierl M**, Noll C, Babinsky V, Ziegler B, Altenberger C, Minichsdorfer C, Lang G, Döme B, End-Pfützenreuter A, Arns BM, Grin Y, Klepetko W, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S: **Genome-wide miRNA expression profiling identifies miR-9-3 and miR-193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers**. Clin Cancer Res. 2012 Mar 15;18(6):1619-29.

Heller G, Babinsky V, Ziegler B, **Weinzierl M**, Noll C, Altenberger C, Müllauer L, Dekan G, Grin Y, Lang G, End-Pfützenreuter A, Womastek I, Zehetmayer S, Döme B, Arns B-M, Fong K, Wright C, Yang I, Bowman R, Klepetko W, Posch M, Zielinski C, Zöchbauer-Müller S: **Genome-wide CpG-island methylation analyses in non-small cell lung cancer patients**. Eingereicht.